

# Charakterisierung der Promotor-Region des *Fre2*-Gens, einer Integrationsstelle des Friend-Mäuseleukämievirus

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Susanne Christine Burdak  
aus Frankfurt am Main

Gießen 1999

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Medizinische Virologie /  
Institut für Medizinische Virologie

Leiter: Prof. Dr. W. Gerlich  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Roland Friedrich

Gutachter: PD Dr. J. Harbott

Tag der Disputation: 26. Juni 2000

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Friend-Virus-induzierte Erythroleukämie	1
1.1.1 Das Friend-Mäuseleukämievirus (F-MuLV)	1
1.1.2 Das Spleen-Focus-Forming-Virus (SFFV)	2
1.1.3 Pathogenese der Friend-Virus-induzierten Erythroleukämie	3
1.1.4 Kontrolle der Leukämogenese durch Wirtsgene	5
1.1.5 Das <i>Fre2</i> -Gen	6
1.2 Leukämien beim Menschen	7
1.2.1 Klassifikation der Leukämien	8
1.2.2 Ätiologie und Epidemiologie	8
1.2.3 Genetische Grundlagen der Leukämogenese	9
1.2.4 Transkriptionsinitiation proteincodierender Gene in Eukaryonten	14
1.3.1 Allgemeine Transkriptionsfaktoren (GTFs)	15
1.3.2 Core-Promotor-Elemente	19
1.3.3 Regulation der Transkription	20
1.4 Experimentelle Untersuchung von Promotorsequenzen mit Hilfe von Reportergen-Assays	23
1.4.1 Luciferase-Assay	24
1.4.2 $\beta$ -Galactosidase-Assay	25
1.5 Zielsetzung der Arbeit	26
<b>2. Methoden</b>	<b>27</b>
2.1 Arbeiten mit DNA	27
2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.1.2 Agarosegelelektrophorese	28
2.1.3 DNA-Elution aus Agarosegelen	28
2.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	30
2.1.5 Ethanolfällung	31
2.1.6 DNA-Mengenbestimmung durch Absorptionsmessung	31
2.1.7 Restriktionsenzymspaltung	31
2.1.8 Enzymatische Behandlung der zu ligierenden DNA	32
2.1.9 Ligation von Vektor und Insert	34
2.1.10 Sequenzierung des Konstruktes	35
2.1.11 Southern-Blot	36
2.1.12 Colony-Blot	37
2.1.13 Radioaktives Hybridisierungsverfahren	38
2.1.14 Nicht-radioaktives Hybridisierungsverfahren (Digoxigenin-System)	39
2.2 Arbeiten mit Bakterien	40
2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien mit Calciumchlorid	40
2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien mit FSB-Puffer	40
2.2.3 Transformation von Bakterien	41
2.2.4 Identifizierung positiver Klone durch PCR	41
2.2.5 Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA	42
2.2.6 Identifikation positiver Klone durch Restriktionsenzymspaltung	43
2.3 Zellkultur	44
2.3.1 Kultur von Rat-1-Zellen	44
2.3.2 Kultur von HCD-57-Zellen	44

2.3.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen	44
2.3.4 Lyse der transfizierten Zellen	46
2.4 Reporter-gen-Assays	46
2.4.1 Luciferase-Assay	46
2.4.2 $\beta$ -Galactosidase-Assay	47
2.5 Proteinbestimmung in Zellysaten	48
<b>3 Material</b>	<b>49</b>
3.1 Puffer, Lösungen und Medien	49
3.2 Oligonucleotide	50
3.3 Enzyme	50
3.4 Plasmidvektoren und Cosmid-Genbank	51
3.5 Zelllinien	51
3.6 Kits	51
3.7 Sonstiges	51
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>53</b>
4.1 Die Core-Promotor-Region des <i>Fre2</i> -Gens	53
4.2 Mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen in der potentiellen Promotor-Region des <i>Fre2</i> -Gens	54
4.3 Klonierung zweier Reporter-gen-konstrukte sowie eines positiven Kontrollvektors	56
4.4 Luciferase-Assays	59
4.4.1 Transfektion von Rat-1-Zellen	59
4.4.2 Transfektion von HCD-57-Zellen	70
4.5 Versuche zur Herstellung einer DNA-Sonde zur Colony-Hybridisierung einer genomischen Cosmid-Bibliothek	71
<b>5 Diskussion</b>	<b>73</b>
5.1 Die Core-Promotor-Region des <i>Fre2</i> -Gens	73
5.2 Upstream-Promotor-Elemente des <i>Fre2</i> -Gens	74
5.3 Vergleich zweier unterschiedlich langer Abschnitte des <i>Fre2</i> -Promotors im Luciferase-Assay	80
5.4 Induktion des <i>Fre2</i> -Promotors durch Wachstumsfaktoren?	81
5.5 Vergleich der Ergebnisse des Luciferase-Assays in Fibroblasten (Rat-1) und hämatopoetischen Zellen (HCD-57)	82
5.6 Bedeutung von Translokationen im Promotorbereich des <i>Fre2</i> -Gens für die Tumorentstehung	82
5.7 Methodische Überlegungen zur Optimierung des Luciferase-Assays für die Untersuchung des <i>Fre2</i> -Promotors	83
5.8 Versuche zur Herstellung einer DNA-Sonde zur Colony-Hybridisierung einer genomischen Cosmid-Bibliothek	85
5.9 Ausblick	85
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>88</b>
<b>8 Abkürzungen</b>	<b>97</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Friend-Virus-induzierte Erythroleukämie

Von Charlotte Friend wurde 1957 erstmals eine durch ein zellfreies Filtrat bei adulten Mäusen ausgelöste Erythroleukämie beschrieben (Friend 1957), die mit Hepatosplenomegalie und Anämie einhergeht. Die Erkrankung wird in empfänglichen Mäusestämmen durch einen Retrovirus-Komplex ausgelöst. Der Friend-Virus-Komplex (FV-Komplex) besteht aus dem replikationskompetenten F-MuLV (Friend murine leukemia virus) und dem replikationsdefizienten SFFV (spleen focus-forming virus). F-MuLV dient als Helfervirus bei der Replikation des SFFV. Der ursprünglich isolierte Virusstamm wurde aufgrund der durch ihn verursachten Anämie mit FV-A, ein später isolierter Polyzythämie-induzierender Stamm mit FV-P bezeichnet (Kabat 1989).

#### 1.1.1 Das Friend-Mäuseleukämievirus (F-MuLV)

Das Friend-Mäuseleukämievirus (F-MuLV) gehört zu den ökotropen Mäuseleukämieviren. Mäuseleukämieviren zeigen einen Wirtszelltropismus, der durch das *env*-Gen-Produkt und dessen Interaktion mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche bestimmt wird (Hunter & Swanstrom 1990; Risser *et al.* 1983):

- Ökotrope Viren können Zellen von Mäusen und naher verwandter Spezies infizieren. Exogene ökotrope Viren wie das F-MuLV werden horizontal verbreitet, während endogene ökotrope Viren wie das AKR-MuLV vertikal an Nachkommen weitergegeben werden.
- Polytrope Viren infizieren sowohl Mäusezellen als auch Zellen anderer Spezies. Aufgrund der Fähigkeit, in Nerzzellkulturen Foci zu induzieren, werden sie auch als "mink cell focus inducing virus" (MCFV) bezeichnet. MCF-Viren entstehen bei Infektion mit ökotropen Viren als Rekombinant aus endogenen polytropen Proviren und ökotropen Viren. Rekombinationen im *env*-Gen führen zu erhöhter Pathogenität.
- Amphotrope Viren konnten bislang nur aus Wildmaus-Populationen isoliert werden, jedoch nicht aus Laborstämmen. Das Wirtszellspektrum ähnelt dem der polytropen Viren.

- Xenotrope Viren sind als endogene Viren weit verbreitet in Inzucht-Mausstämmen. Sie sind nicht zur Infektion dieser Zellen in der Lage, können jedoch Zellen anderer Spezies infizieren.

Das F-MuLV besitzt ein vollständiges retrovirales Genom bestehend aus *gag*-, *pol*- und *env*-Gen, jedoch kein virales Onkogen. Nach Inokulation des Virus in neugeborene Mäuse empfindlicher Stämme entsteht zunächst eine hämolytische Anämie mit Splenomegalie, die häufig innerhalb von 2-3 Monaten zum Tode führt. Überleben die Mäuse, kommt es in einem späteren Stadium zur Entwicklung einer Erythroleukämie (Sitbon *et al.* 1986). Während die Entstehung der Anämie im Zusammenhang mit dem *env*-Gen des F-MuLV zu stehen scheint (Sitbon *et al.* 1986), wird die Erythroleukämie nach Infektion mit F-MuLV mit dem Auftreten rekombinierter F-MCF-Viren in Verbindung gebracht (Ruscetti *et al.* 1981). Im Zusammenhang mit F-MuLV-Infektionen neugeborener Mäuse wird auch die Entstehung anderer hämatologischer Neoplasien wie myeloider Leukämien und Lymphome beschrieben (Silver & Kozak 1986). In späteren Phasen der Leukämieentwicklung kommt es zur Provirusintegration in das Wirtsgenom, häufig in der Nähe zellulärer Onkogene.

### 1.1.2 Das Spleen-Focus-Forming-Virus (SFFV)

Das replikationsdefiziente SFFV ist verantwortlich für die Fähigkeit des FV-Komplexes, eine rasch fortschreitende Erythroleukämie in adulten Mäusen zu verursachen. SFFV besitzt ein verändertes *env*-Gen, das für ein Fusionsprotein aus N-Terminus des gp70 von MCF-Viren und C-Terminus des p15E codiert (Wolff *et al.* 1985). Das SFFV-*env*-Gen ist vermutlich durch Deletion eines 585-bp-Fragmentes und einer Baseninsertion aus einem MCF-*env*-Gen hervorgegangen und scheint eine Hauptrolle in der Pathogenese der FV-Erythroleukämie zu spielen (Kabat 1989). Der unterschiedliche Phänotyp der durch FV-P und FV-A verursachten Erkrankungen erklärt sich durch zwei Varianten des SFFV, SFFV<sub>P</sub> und SFFV<sub>A</sub>, die sich in ihrem *env*-Gen unterscheiden. Beide Varianten differieren im Ausmaß der induzierten Erythropoetin-Unabhängigkeit: Zellen SFFV<sub>P</sub>-infizierter Mäuse bilden CFU-Es (colony-forming unit-erythroid) in Abwesenheit von Erythropoetin (Epo), während Zellen SFFV<sub>A</sub>-infizierter Mäuse hierzu geringe Mengen Epo benötigen, die aber unterhalb der von nicht infizierten Zellen benötigten Menge liegen. Den Virusvarianten gemeinsam ist ihre Fähigkeit, die Proliferation erythroider Vorläuferzellen zu steigern und deren Differenzierung unter Bedin-

gungen zu ermöglichen, die in nicht infizierten Zellen suboptimal sind (Ruscetti & Wolff 1984).

### 1.1.3 Pathogenese der Friend-Virus-induzierten Erythroleukämie

Viele Retroviren, die eine schnell fortschreitende Neoplasie auslösen, besitzen ein klassisches virales Onkogen (v-onc), das eine modifizierte Version eines zellulären Gens (Protoonkogen oder c-onc) darstellt. Ein solches Onkogen fehlt dem Friend-Virus-Komplex. Die Pathogenese der Friend-Erythroleukämie beruht vermutlich auf zwei Mechanismen (Kabat 1989): (1) Das durch das *env*-Gen des SFFV codierte und auf der Oberfläche infizierter Erythroblasten exprimierte Glycoprotein gp55 verursacht eine polyklonale Proliferation dieser Zellen, die aber weiterhin terminal differenzieren können und über eine begrenzte Teilungsrate verfügen. (2) Durch provirale Integration in das Wirtsgenom kann es mittels Aktivierung oder Inaktivierung zellulärer Gene zur Immortalisierung der Zelle und zum Verlust der Differenzierungsfähigkeit kommen. Die leukämischen Zellen dieser Phase sind mono- oder oligoklonalen Ursprungs (Schulz *et al.* 1988).

#### 1.1.3.1 Gp55

Gp55 bindet an den Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) und imitiert die Wirkung von Erythropoetin (Epo), was zu einer verlängerten Proliferationsphase infizierter erythroider Zellen führt (Li *et al.* 1990). Nach Bindung des Epo an den EpoR beobachtet man eine Phosphorylierung der Tyrosinkinase JAK2 und des Transkriptionsfaktors STAT5. In gp55-stimulierten erythroiden Zellen findet sich eine konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase JAK1 sowie des Transkriptionsfaktor STAT5. Die Translokation des STAT5 in den Zellkern sowie dessen sequenzspezifische DNA-Bindung ist jedoch auch in gp55-stimulierten Zellen Epo-abhängig (Yamamura *et al.* 1998). In SFFV-infizierten Zellen kommt es außerdem zur konstitutiven Aktivierung des Raf-1/MAP-Kinase-Signalwegs und Expression der Transkriptionsfaktoren c-Jun und JunB, so daß als Folge möglicherweise eine deregulierte AP1-Aktivität auftritt (Muszynski 1998).

### 1.1.3.2 Provirusintegrationsstellen von F-MuLV und SFFV im Mausgenom

Über Wechselwirkungen zwischen viralen Hüllproteinen und zellulären Membranrezeptoren kommt es unter Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran zum Eindringen des Viruscapsids in die Zelle, wo bereits im Zytoplasma die Transkription der viralen RNA in doppelsträngige DNA durch die virale reverse Transkriptase stattfindet. Der Nukleocapsidkomplex wird in den Zellkern transportiert, und mit Hilfe der viralen Integrase wird das virale Genom in das Genom der Wirtszelle integriert. Die Integration ist Voraussetzung für die Expression viraler Gene (Modrow & Falke 1997).

Als Folge der Integration kann es zur Inaktivierung zellulärer Gene durch Insertion innerhalb codierender Bereiche oder regulatorischer Sequenzen eines Gens kommen. Häufig führt die Provirusintegration in das zelluläre Genom jedoch zur Aktivierung von Genen. Innerhalb der retroviren LTR ("long terminal repeat") finden sich starke Promotor- und Enhancerelemente, welche die Expression benachbarter sowie weiter entfernt gelegener Gene aktivieren können (Kung *et al.* 1991; Tsichlis & Lazo 1991).

Die Integration in das Wirtsgenom erfolgt sequenzunabhängig. Ein möglicher Einfluß anderer Faktoren wie der Chromatinstruktur unter Bevorzugung transkriptionsaktiver, DNase-I-hypersensitiver Bereiche wird beschrieben (Kung *et al.* 1991). Bestimmte Gene sind in verschiedenen, unabhängig voneinander entstandenen Tumoren wiederholt von Provirusintegrationen in ihrer Nähe betroffen ("common integration site"). Die Aktivierung dieser Gene bietet offenbar einen Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen, was zur Tumorentstehung führt. Deshalb werden durch Identifizierung von Integrationsstellen häufig benachbarte zelluläre Onkogene entdeckt (Jonkers 1996). Folgende Integrationsstellen sind im Rahmen der Erythroleukämie-Entwicklung häufig betroffen:

*Spi-1*: In 95% der FV- oder SFFV-induzierten Erythroleukämien findet sich eine Aktivierung des Gens *Spi-1* (SFFV proviral integration) durch Provirusintegration (Moreau-Gachelin *et al.* 1988). *Spi-1* ist identisch mit PU.1, einem Transkriptionsfaktor mit Homologie zur *ets*-Familie.

*Fli-1*: Ein Rearrangement der Integrationsstelle *Fli-1* wird in 75-90% der F-MuLV-induzierten Erythroleukämien beobachtet. *Fli-1* ist ein Mitglied der *ets*-Gen-Familie (Ben-David, *et al.* 1991; Sels *et al.* 1992).

*Fli-2*: Eine Integration im *Fli-2*-Locus wird bei F-MuLV- und FV-P-induzierten Erythroleukämien beobachtet. Dadurch kommt es zur Inaktivierung des erythroiden Transkriptionsfaktors NF-E2 (Lu *et al.* 1994).



Epo und Epo-R: In verschiedenen F-MuLV-induzierten erythroleukämischen Zelllinien ist das *Epo*-Gen rearrangiert und amplifiziert. Daraus resultiert eine konstitutive *Epo*-Produktion (McDonald *et al.* 1987). Durch SFFV-Provirus-Integration kommt es zur Aktivierung des *Epo-R* (Lacombe *et al.* 1991).

Fre2: Der *Fre2*-Locus stellt eine weitere Integrationsstelle des F-MuLV in primären Milztumoren erythroleukämischer Mäuse dar. Ein Rearrangement des *Fre2*-Locus wurde in Milztumoren auch ohne nachweisbare Provirusintegration gefunden. Das *Fre2*-Gen ist auf dem Chromosom 9 der Maus mit einem maximalen Abstand von 1,2 cM vom *Fv2*-Locus entfernt lokalisiert. Eine mögliche Identität der beiden Gene wird diskutiert (Friedrich *et al.* 1997).

p53: Das Tumorsuppressorgen *p53* ist häufig in FV-, SFFV- und F-MuLV-induzierten Erythroleukämien von Provirusintegrationen betroffen. Außerdem werden Deletionen und Punktmutationen des *p53* beobachten. Alle diese Veränderungen führen entweder zum völligen Fehlen des *p53*-Genprodukts oder zur Synthese eines verkürzten Proteins (Jonkers 1996).

### 1.1.4 Kontrolle der Leukämogenese durch Wirtsgene

Eine Reihe von Genen beeinflusst die Empfänglichkeit von Mäusen für eine F-MuLV-induzierte Leukämie über verschiedene Mechanismen (Tsichlis & Lazo 1991):

1. Beeinflussung von Adsorption, Virusreplikation oder Provirusintegration (*Fv1*, *Fv4/Akrv-1*, *Fv6/Rmcf*, *Gv-1*, *Gv-2*, *Srv-1*, *Rgv-2*)
2. Modulation der Immunantwort des Wirtes (*Rgv-1*, *Rfv-1*, *Rfv-2*, *hr*, *Rfv-3*)
3. Regulation der Anzahl potentieller Zielzellen des Virus (*Fv2*, *W*, *Sl*, *f*, *nu*)
4. Modulation des Erkrankungstyps (Anämie vs. Polyzythämie; *Fv5*)

Bei einigen dieser Gene ist Näheres über den Mechanismus der Resistenzvermittlung bekannt:

Fv1: Das *Fv1*-Gen ist dafür verantwortlich, daß ökotrope F-MuLVs eine weitere Wirtszellrestriktion aufweisen: Das Allel *Fv1*<sup>n</sup> erlaubt die Infektion durch N-trope Viren, verhindert aber die Infektion mit B-tropen Viren, während das Allel *Fv1*<sup>b</sup> eine Infektion mit B-tropen Viren ermöglicht, N-trope Viren jedoch blockiert (Tsichlis & Lazo 1991; Goff 1996). Das *Fv1*-Gen wurde als *gag*-Gen mit Sequenzähnlichkeit zu humanen endogenen Retroviren (HERV-L) identifiziert. Ein Modell der Wirkungsweise von *Fv1* als Resistenzgen beinhaltet die Bindung des *Fv1*-Genproduktes an Gag-Proteine des Präintegrationskomplexes und Blockierung dessen Transports in den Zellkern (Goff 1996).

Fv4: Das  $Fv4^r$  Allel ist durch die Insertion eines defekten ökotropen Provirus im  $Fv4$ -Locus charakterisiert (Ikeda *et al.* 1985). Die Expression des *env*-Gens unter der Kontrolle eines benachbarten zellulären Promotors führt zur Virusinterferenz und Resistenz gegenüber der Infektion mit ökotropen MuLVs (Ikeda & Sugimura 1989).

Fv6/Rmcf: Das dominante  $Rmcf^r$ -Allel zeichnet sich durch Expression eines MCF-Hüllproteins auf der Oberfläche hämatopoetischen Zellen aus, was durch Virusinterferenz eine Resistenz gegenüber der Infektion mit MCF-Viren bedingt (Ruscetti *et al.* 1981). Der  $Fv6/Rmcf$ -Locus beinhaltet vermutlich ein regulatorisches Gen, das die Expression eines MCF-Hüllproteins in hämatopoetischen Zellen kontrolliert (Tsichlis & Lazo 1991).

Rgv-1, Rfv-1 und Rfv-2: Die Gene *Rgv-1*, *Rfv-1* und *Rfv-2* gehören zum  $H2$ -Locus der Maus und beeinflussen die Immunantwort auf eine Infektion mit MuLVs (Tsichlis & Lazo 1991).

Fv2: Das  $Fv2$ -Gen liegt in den Allelen  $Fv2^r$  und  $Fv2^s$  vor.  $Fv2^r$  vermittelt Resistenz gegenüber der Entwicklung einer Friend-Virus-induzierten Erythroleukämie, während  $Fv2^s$  als dominantes Allel Suszeptibilität vermittelt (Tsichlis & Lazo 1991). Die Mehrheit der BFU-E-Population (burst-forming unit-erythroid) in  $Fv2^{r/r}$ -Mäusen befindet sich im Gegensatz zu  $Fv2^{s/s}$ -Mäusen nicht im Zellzyklus (Ben-David & Bernstein 1991). Der  $Fv2$ -Locus kontrolliert möglicherweise die Aktivität eines negativen Regulators, der in BFU-E-Zellen zur Reduktion der DNA-Synthese führt und Teil eines negativen Kontrollmechanismus früher erythroider Vorläuferzellen ist (Axelrad *et al.* 1981).

W und Sl: Mutationen in *W* und *Sl* führen zur Reduktion der Anzahl an erythroiden Vorläuferzellen. *W* codiert für den c-Kit-Rezeptor, *Sl* für den Liganden dieses Rezeptors. Möglicherweise beruht die durch *W* und *Sl* vermittelte Resistenz auf der Verminderung an Zielzellen des Friend-Virus. Alternativ wird die Aktivierung des Kit-Signalwegs als notwendige Voraussetzung für die Induktion einer Erythroleukämie diskutiert, so daß die Resistenz auch durch einen Defekt des Kit-Rezeptors oder Fehlen seines Liganden verursacht sein könnte (Ben-David & Bernstein 1991).

### 1.1.5 Das *Fre2*-Gen

Die Integration eines F-MuLV-Provirus im  $Fre2$ -Locus in primären Milztumoren erythroleukämischer Mäuse führte zur Isolierung des  $Fre2$ -Gens. In weiteren Milztumoren wurde ein Rearrangement des  $Fre2$ -Locus auch ohne nachweisbare Provirusintegration gefunden (Eisel *et al.* 1997). Stromabwärts der  $Fre2$ -Integrationsstelle des F-MuLV-Provirus liegt der codie-

rende Bereich des *Fre2*-Gens bestehend aus drei Exons, die von zwei größeren Introns unterbrochen werden. Ein intronfreies offenes Leseraster (open reading frame; ORF) von 1302 Nukleotiden befindet sich im Exon 2. Aus einer gemeinsamen Vorläufer-mRNA entstehen zwei unterschiedlich lange mRNAs (3,7 kb und 1,9 kb), was vermutlich im Zusammenhang mit der RNA-Editierung eines Nukleotids im 3'-nichtcodierenden Bereich der kleineren mRNA steht. In verschiedenen Geweben werden eine 1,9-kb-mRNA und eine 3,7-kb-mRNA im Verhältnis 2,5:1 exprimiert. Die *Fre2*-Expression ist in hämatopoetischen Zelllinien deutlich höher als in nicht-hämatopoetischen. Ein *Fre2*-homologes Gen existiert auch beim Menschen. Die Funktion des *Fre2*-Genproduktes ist noch unbekannt. Das Vorliegen einer Lysin-Alanin-reichen Domäne könnte sowohl für ein DNA-bindendes Kernprotein als auch für ein cytosolisches Protein sprechen, das Protein-Protein-Interaktionen eingeht. Eine mögliche Identität mit dem *Fv2*-Gen ist nicht ausgeschlossen (Pass 1995; Eisel 1997; Friedrich *et al.* 1997).

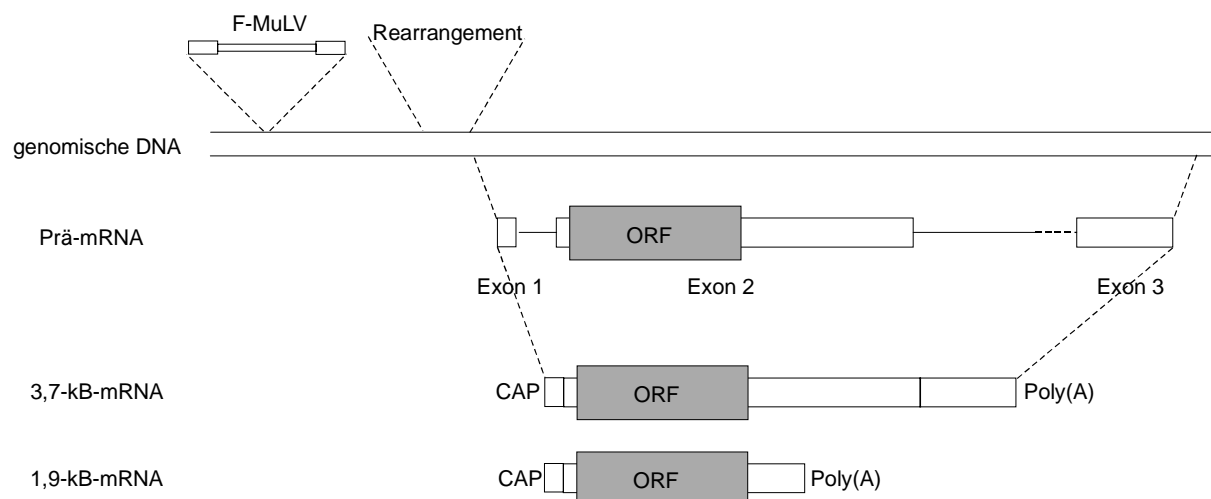


Abbildung 1: Struktur des *Fre2*-Gens (nach Eisel 1997; Friedrich *et al.* 1997)

## 1.2 Leukämien beim Menschen

Der Begriff Leukämie beschreibt eine unkontrollierte Proliferation oder Expansion hämatopoetischer Zellen, welche die Fähigkeit zur Differenzierung in reife Blutzellen verloren haben (Sawyers *et al.* 1991).

### 1.2.1 Klassifikation der Leukämien

Leukämien werden entsprechend der betroffenen Zelllinie in myeloische oder lymphatische Leukämien eingeteilt. Eine weitere Klassifikation erfolgt in akute und chronische Leukämien. Akute Leukämien werden entsprechend der FAB-Klassifikation (French-American-British) weiter unterteilt.

AML	ALL
M1: Myeloblastär ohne Differenzierung	L1: Einheitlich kleine Zellen
M2: Myeloblastär mit Differenzierung	L2: Unterschiedliche Zellgröße
M3: Hypergranulär promyelozytär	L3: Einheitlich große Zellen
M4: Myelomonozytär	
M5: Monozytär	
M6: Erythroleukämie	
M7: Megakaryoblastär	

**Tabelle 1: FAB-Klassifikation der akuten Leukämien (nach: Gross & Heimpel 1994)**

### 1.2.2 Ätiologie und Epidemiologie

Jährlich treten weltweit etwa 250000 neue Leukämiefälle auf. Die Inzidenz aller Leukämien liegt bei 8-9/100000 pro Jahr. 60% der Leukämien sind akute Leukämien (ALL und AML), 15% entfallen auf chronisch-myeloische Leukämien (CML) und 25% auf chronisch-lymphatische Leukämien (CLL; Schiffer & Schimpff 1991).

Für die Leukämieentstehung werden zahlreiche Risikofaktoren diskutiert:

Eine genetische Prädisposition für Leukämien wird für einige Erbkrankheiten beschrieben: Beim Down-Syndrom (Trisomie 21) besteht ein 10-30fach erhöhtes Erkrankungsrisiko für Leukämien (Robinson 1992); für Ataxia telangiectasia (AT) soll das kumulative Risiko, in der Kindheit an Leukämie zu erkranken, bis zu 10% betragen (Zeeb & Blettner 1998). Beim Bloom-Syndrom und bei der Fanconi-Anämie, die mit Chromosomeninstabilität verbunden sind, ist das Leukämierisiko ebenfalls erhöht (Zeeb & Blettner 1998; Ruddon 1995).

Verschiedene Chemikalien werden mit einem erhöhten Leukämierisiko in Verbindung gebracht. Benzolexposition, z.B. am Arbeitsplatz, ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für AML verbunden (Brandt 1992). Ethylenoxid ist mit einem erhöhten Auftreten von lymphatischen Leukämien assoziiert (Stayner *et al.* 1993).

Ionisierende Strahlung wird als Risikofaktor für AML, ALL und CML jedoch nicht für CLL gewertet. Hohe Strahlendosen führen zu einem deutlichen Anstieg der Zahl der Leukämieerkrankungen; so werden 50% der Leukämien bei Überlebenden der Atombombenexplosionen von Hiroshima und Nagasaki auf Strahleneinwirkung zurückgeführt. Auch therapeutische

Bestrahlung wie z.B. bei Spondylitis ankylosans führt zu einem erhöhten Leukämierisiko (Darby *et al.* 1987). Über das Risiko niedriger Strahlendosen für Leukämieerkrankungen sind zahlreiche Studien mit kontroversen Ergebnissen durchgeführt worden. Ein erhöhtes Risiko für akute Leukämien wird für Kinder beschrieben, die *in utero* diagnostischer Bestrahlung ausgesetzt waren. Der hier auftretende Zuwachs an AML und ALL wird auf 40-60% geschätzt (Zeeb & Blettner 1998).

Chemotherapeutika, die in der Behandlung von malignen Tumoren eingesetzt werden, bergen ein hohes Risiko bezüglich des Auftretens sekundärer Leukämien. Ein 10-100fach erhöhtes Risiko wurde für das Auftreten von AML nach Chemotherapie beschrieben. Das Risiko steigt mit der Dosis, der Anzahl der Zyklen, der Anzahl der miteinander kombinierten Chemotherapeutika und der Behandlungsdauer (Zeeb & Blettner 1998). Zwei verschiedene Formen sekundärer AML wurden identifiziert: Nach Behandlung mit Topoisomerase-Inhibitoren treten frühzeitig AML mit FAB-M4/M5-Morphologie auf, während AML-Erkrankungen nach Behandlung mit alkylierenden Agentien spät auftreten und FAB-M1/M2-Morphologie aufweisen (Shpilberg *et al.* 1997).

Das humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1 (HTLV-1) gilt als Erreger der adulten T-Zell-Leukämie (ATL), die in Japan, der Karibik, Südamerika und Afrika endemisch bei Erwachsenen auftritt. HTLV-1 infiziert CD4-positive Zellen und kann als Retrovirus in das Genom integrieren. Die Übertragung des Virus erfolgt durch infizierte Zellen (Modrow & Falke 1997). Das humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ 2 (HTLV-2) wurde aus einer T-Zelllinie einer Haarzelleukämie isoliert (Kalyanaraman *et al.* 1982).

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wird in kausale Beziehung zum Auftreten des in Afrika verbreiteten Burkitt-Lymphoms gesetzt (Modrow & Falke 1997).

Die derzeit bekannten Risikofaktoren für die Leukämieentstehung erklären etwa 15-20% der weltweit neu auftretenden Leukämieerkrankungen. In der Mehrzahl der Fälle ist die Ursache unklar (Zeeb & Blettner 1998).

### 1.2.3 Genetische Grundlagen der Leukämogenese

Typische genetische Veränderungen bei Leukämien und Lymphomen sind reziproke Chromosomentranslokationen. Darüber hinaus werden Inversionen, Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen beobachtet. Die molekulare Charakterisierung dieser Chromosomenrear-

rangements ermöglicht die Identifikation von Genen, die an der Leukämieentstehung beteiligt sind.

Bei den in lymphatischen Leukämien gefundenen Translokationen sind häufig die Chromosomen 14 und 7 beteiligt, auf denen die Gene für die schweren Ketten der Immunglobuline und der T-Zell-Rezeptoren liegen. Diese Gene werden im Verlauf der Differenzierung von B- bzw. T-Lymphozyten rearrangiert und stellen offenbar Prädilektionsstellen für Translokationen dar. Gene, die in *IG*- und *TCR*-Loci transloziert werden, codieren in der Regel für intakte Proteine, die unter dem Einfluß stark aktiver regulatorischer Sequenzen dereguliert und überexprimiert werden (Yunis 1983; Wagener 1996).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über Translokationen, an denen *IG*- und *TCR*-Loci beteiligt sind:

Translokation	Betroffenes Gen	Erkrankung	Translokationspartner
t(8;14)(q24;q32)	<i>c-MYC</i> (8q24)	BL, BL-ALL	IgH, IgL
t(2;8)(p12;q24)	<i>c-MYC</i> (8q24)	BL, BL-ALL	IgH, IgL
t(8;22)(q24;q11)	<i>c-MYC</i> (8q24)	BL, BL-ALL	IgH, IgL
t(8;14)(q24;q11)	<i>c-MYC</i> (8q24)	T-ALL	TCR- $\alpha$
t(8;12)(q24;q22)	<i>c-MYC</i> (8q24) <i>BTG</i> (12q22)	B-CLL/ALL	--
t(7;19)(q35;p13)	<i>LYL1</i> (19p13)	T-ALL	TCR- $\beta$
t(1;14)(p32;q11)	<i>TAL1/SCL</i> (1p32)	T-ALL	TCR- $\alpha$
t(7;9)(q35;q34)	<i>TAL2</i> (9q34)	T-ALL	TCR- $\beta$
t(11;14)(p15;q11)	<i>RBTN1/Ttg1</i> (11p15)	T-ALL	TCR- $\delta$
t(11;14)(p13;q11)	<i>RBTN2/Ttg2</i> (11p13)	T-ALL	TCR- $\delta/\alpha$
t(7;11)(q35;p13)	<i>RBTN2/Ttg2</i> (11p13)	T-ALL	TCR- $\beta$
t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11</i> (10q24)	T-ALL	TCR- $\alpha/\beta$
t(7;10)(q35;q24)	<i>HOX11</i> (10q24)	T-ALL	TCR- $\alpha/\beta$
t(3;14)(q27;q32)	<i>Laz3/BCL-6</i> (3q27)	NHL/DLCL	IgH
t(3;4)(q27;p11)	<i>Laz3/BCL-6</i> (3q27)	NHL	--
t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL-1/(PRAD-1)</i> (11q13)	B-CLL u.a.	IgH
t(14;18)(q32;q21)	<i>BCL-2</i> (18q21)	FL	IgH, IgL
t(14;19)(q32;q13.1)	<i>BCL-3</i> (19q13.1)	B-CLL	IgH
inv14 & t(14;14)(q11;q32)	<i>TCL-1</i> (14q32.1)	T-CLL	TCR-C $\alpha$
t(10;14)(q24;q32)	<i>lyt-10</i> (10q24)	B-Lymphom	IgH
t(5;14)(q31;q32)	<i>IL-3</i> (5q31)	Prä-B-ALL	IgH
t(7;9)(q34;q34.3)	<i>TANI</i> (9q34.3)	T-ALL	TCR- $\beta$
t(1;7)(p34;q34)	<i>LCK</i> (1p34)	T-ALL	TCR- $\beta$
t(X;14)(q28;q11)	<i>C6.1B</i> (Xq28)	T-PLL	TCR- $\alpha$

**Tabelle 2: Rearrangements in hämatologischen Neoplasien mit Beteiligung von *IG*- oder *TCR*-Loci ohne Entstehung von Fusionsproteinen (nach Rabbits 1994 und Solomon 1991); BL: Burkitt-Lymphom; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; DLCL: "diffuse large cell lymphoma"; FL: Follikuläres Lymphom; TCR: T-Zell-Rezeptor**

Eine andere mögliche Folge von Chromosomenrearrangements ist die Entstehung von Fusionsgenen. Auf diese Weise werden chimäre Onkoproteine gebildet, die funktionelle Domänen beider Fusionspartner tragen (Solomon 1991). Folgende Fusionsgene wurden bei Leukämien beschrieben:

Translokation/Inversion	Betroffene Gene	Erkrankung
inv(14)(q11q32)	<i>TCR-α</i> (14q11); <i>VH</i> (14q32)	T/B-Zell-Lymphom
t(9;22)(q34;q11)	<i>c-ABL</i> (9q34); <i>BCR</i> (22q11)	CML/ALL
t(1;19)(q23;p13.3)	<i>PBX1</i> (1q23); <i>E2A</i> (19p13.3)	Prä-B-ALL
t(17;19)(q22;p13)	<i>HLF</i> (17q22); <i>E2A</i> (19p13)	Prä-B-ALL
t(15;17)(q21;q11-22)	<i>PML</i> (15q21); <i>RARα</i> (17q21)	APL
t(11;17)(q23;q21.1)	<i>PLZF</i> (11q23); <i>RARα</i> (17q21)	APL
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL</i> (11q23); <i>AF4</i> (4q21)	ALL/Prä-B-ALL/AML
t(9;11)(q21;q23)	<i>MLL</i> (11q23); <i>AF9/MLLT3</i> (9p22)	ALL/Prä-B-ALL/AML
t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL</i> (11q23); <i>ENL</i> (19p13)	Prä-B-ALL/T-ALL/AML
t(X;11)(q13;q23)	<i>MLL</i> (11q23); <i>AFX1</i> (Xq13)	T-ALL
t(1;11)(p32;q23)	<i>MLL</i> (11q23); <i>AF1P</i> (1p32)	ALL
t(6;11)(q27;q23)	<i>MLL</i> (11q23); <i>AF6</i> (6q27)	ALL
t(11;17)(q23;q21)	<i>MLL</i> (11q23); <i>AF17</i> (17q21)	AML
t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1/CBFα</i> (21q22); <i>ETO/MTG8</i> (8q22)	AML
t(3;21)(q26;q22)	<i>AML1</i> (21q22); <i>EVI-1</i> (3q26)	CML
t(3;21)(q26;q22)	<i>AML1</i> (21q22); <i>EAP</i> (3q26)	Myelodysplasie
t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS</i> (16p11); <i>ERG</i> (21q22)	Myeloid
t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK</i> (6p23); <i>CAN</i> (9q34)	AML
t(9;9)	<i>SET</i> (9q34); <i>CAN</i> (9q34)	AUL
t(4;16)(q26;p13)	<i>IL-2</i> (4q26); <i>BCM</i> (16p13.1)	T-Lymphom
inv(2;2)(p13;p11.2-14)	<i>REL</i> (2p13); <i>NRG</i> (2p11.2-14)	NHL
inv(16)(p13;q22)	Myosin <i>MYH11</i> (16p13); <i>CBF-β</i> (16q22)	AML
t(5;12)(q33;p13)	<i>PDGF-β</i> (5q33); <i>TEL</i> (12p13)	CMML
t(2;5)(2p23;q35)	<i>NPM</i> (5q35); <i>ALK</i> (2p23)	NHL

**Tabelle 3: Rearrangements in hämatologischen Neoplasien mit Entstehung von Fusionsproteinen (nach Rabbits 1994 und Solomon 1991); APL: akute Promyelozytenleukämie FAB M3; AUL: akute undifferenzierte Leukämie; CMML: chronisch myelomonozytäre Leukämie; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom**

### 1.2.3.1 Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Mediatoren

Zahlreiche Translokationen betreffen Gene von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Die hieraus resultierenden Fusionsproteine sind häufig konstitutiv aktiv. Auch Mutationen in extrazellulären Rezeptordomänen können zur Aktivierung führen. Schließlich wird auch durch die Überexpression von Wachstumsfaktoren eine verstärkte Rezeptoraktivierung verursacht. Einige Beispiele verdeutlichen die Bedeutung dieser Mechanismen in der Leukämogenese:

Das *FMS*-Gen codiert für den M-CSF-Rezeptor, ein Tyrosinkinase-Transmembranprotein. Bei 10% der Patienten mit AML oder myelodysplastischem Syndrom (MDS) finden sich Mutationen im *FMS*-Gen (Sawyers 1991)

ALK ist eine rezeptorähnliche Protein-Tyrosin-Kinase (PTK), die physiologisch durch Ligandenbindung dimerisiert. Im NPM/ALK-Fusionsprotein bei der Translokation t(2;5), die beim Non-Hodgkin-Lymphom gefunden wird, ist die cytoplasmatische Domäne von ALK mit dem N-Terminus des Nucleophosmin (NPM) gekoppelt, was zur konstitutiven Dimerisierung und Aktivierung führt (Hunter 1997).

Die ABL-Tyrosinkinase ist Bestandteil des *BCR/ABL*-Hybridgen, das durch die Translokation t(9;22) des Philadelphiachromosoms entsteht. Bei der CML liegt ein 210-kDa-Phosphoprotein vor; in ALL-Zellen findet sich ein 185-kDa Phosphoprotein. Beide Proteine haben die gleiche ABL-Komponente, die im Fusionsprotein eine deregulierte Tyrosinkinase-Aktivität besitzt (Ruddon 1995).

Beim MDS führen Punktmutationen zur Aktivierung des *N-RAS*- und *Ki-RAS*-Gens (Sawyers 1991). Die Gene der *RAS*-Familie codieren für membranständige G-Proteine. *RAS*-Proteine binden in der aktiven Form GTP. *RASGAP* (GTPase-aktivierendes Protein) aktiviert die GTPase normaler *RAS*-Proteine, jedoch nicht die der Mutanten, so daß die mutierten *RAS*-Proteine im aktiven Zustand verbleiben und nachgeschaltete Faktoren der Signalkaskade verstärkt aktivieren. Einige dieser nachgeordneten Faktoren besitzen transformierende Eigenschaften (Lowy & Willumsen 1993; Hunter 1997).

Eine Überexpression des Wachstumsfaktors IL-3 durch Translokation des *IL-3*-Gens (5q31) in den *IG*-Locus (14q32) und nachfolgender Deregulation ist an der Entstehung der Prä-B-ALL beteiligt (Sawyers 1991; Solomon *et al.* 1991). Es wird angenommen, daß die *IL-3*-Überexpression nicht allein für die Transformation verantwortlich ist (Sawyers 1991).

Deletionen im langen Arms von Chromosom 5 wurden in AML und MDS gefunden. Die Region 5q21-31 enthält Gene für hämatopoetische Wachstumsfaktoren (IL-3, IL-4, IL-5, M-CSF, GM-CSF, IL-9) und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (M-CSF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor), die an der myeloiden Differenzierung beteiligt sind (Sawyers 1991; Solomon *et al.* 1991).

### 1.2.3.2 Transkriptionsfaktoren

Ebenfalls häufig von Translokationen betroffen sind Gene, die für Transkriptionsfaktoren codieren. Man beobachtet sowohl deregulierte Expression durch Translokation in *IG*- und *TCR*-Loci, als auch die Bildung von Fusionsproteinen.

Das *MYC*-Gen ist an typischen Translokationen beim Burkitt-Lymphom beteiligt, wo es durch Translokation in *IG*- und *TCR*-Loci überexprimiert wird, was zur raschen Zellzyklusprogression der betroffenen Zellen und zur Blockierung der Differenzierung führt. *MYC* ist ein Transkriptionsfaktor, der als Heterodimer mit MAX sequenzspezifisch an DNA bindet. Für die Aktivierung der Transkription ist allein *MYC* verantwortlich, da MAX keine Transaktivierungsdomäne besitzt. MAX/MAX-Homodimere wirken als Repressoren. Eine *MYC*-Überexpression würde in diesem Modell zur verstärkten Expression *MYC*-regulierter Gene führen.



Allerdings wurde für MYC auch eine Repressorfunktion durch Interaktion mit Faktoren, die an das Initiatorelement binden, beschrieben (Rabbitts 1994; Packham & Cleveland 1995).

Verschiedene Translokationen, die bei akuten Leukämien von Kindern auftreten, betreffen das *MLL*-Gen. Der Bruchpunkt liegt innerhalb der codierenden Region des Gens, so daß im Fusionsprotein die Zink-Finger-Domäne fehlt, die möglicherweise die spezifische DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors vermittelt. Erhalten bleibt ein A-T-Hook, der unspezifische DNA-Bindung ermöglicht, und eine Region mit Homologie zu Säuger-Methyltransferasen, die Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA mit Beeinträchtigung der Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene ermöglichen könnte (Rabbitts 1994).

*TAL1/SCL* ist an der Translokation t(1;14) beteiligt und in 25 % der T-ALL bei Kindern von submikroskopischen Deletionen im 5'-Bereich betroffen. TAL1 bindet als Dimer mit E47 an DNA. Die Translokation führt durch ektope *TAL1*-Expression zur Aktivierung von Genen, die in T-Zellen normalerweise nicht exprimiert werden (Rabbitts 1994, Cobaleda *et al.* 1998).

### 1.2.3.3 Apoptose

Apoptose spielt als programmierter Zelltod eine wesentliche Rolle in der Entwicklung vielzelliger Organismen, in der Kontrolle solcher Zellpopulationen, die sich kontinuierlich erneuern, und bei der Verhinderung der Tumorentstehung (Packham & Cleveland 1995). Einige Gene, denen eine Beteiligung an Apoptose zugeschrieben wird, sind bei Leukämien von Translokationen oder anderen genetischen Veränderungen betroffen.

Die Translokation t(14;18) in Follikulären Lymphomen führt zur Überexpression von *BCL-2*. *BCL-2* verhindert Apoptose in einem breiten Spektrum an Zelltypen. Zur *BCL-2*-Genfamilie gehören sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirkende Faktoren. *BCL-2* bildet Heterodimere mit BAX, was obligat für die Funktion von *BCL-2* ist. Bei einem Überschuß an BAX bilden sich BAX-Homodimere, die pro-apoptotisch wirken. Zwei alternative Spleißformen des *BCL-X*, einem weiteren Mitglied der *BCL-2*-Familie, beeinflussen die *BCL-2*-Wirkung: *BCL-X<sub>L</sub>* unterdrückt synergistisch mit *BCL-2* die Apoptose, während *BCL-X<sub>S</sub>* die *BCL-2*-Wirkung antagonisiert. Ein weiterer Antagonist von *BCL-2* ist BAD. Neben der direkten Regulation der *BCL-2*-Expression wird die *BCL-2*-Wirkung durch Interaktionen dieser Proteine reguliert (Packham & Cleveland 1995; Gajewski & Thompson 1996).

Die Expression von *MYC* führt unter bestimmten Umständen (z.B. Mangel an Wachstumsfaktoren) zur Apoptoseinduktion, was zunächst im Widerspruch zur onkogenen Wirkung von *MYC* steht. Eine Reihe von Genen kooperieren mit *MYC* in der Onkogenese (z.B. *BCL-2*,

*PIM-1*, *RAF-1*, *ABL*) und bewirken ihrerseits Apoptoseinhibition. Die Unterdrückung der MYC-induzierten Apoptose durch BCL-2, jedoch nicht der Wirkung von MYC auf die Zellzyklusprogression, kann das Proliferationspotential MYC-überexprimierender Zellen erklären (Packham & Cleveland 1995).

#### 1.2.3.4 Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen

Mutationen im Tumorsuppressorgen *P53* finden sich in weniger als 10% der Leukämien (Wagener 1996). Diese Mutationen oder auch Rearrangements in *P53* wurden bei CML-Patienten in der Blastenkrise und in menschlichen T-Zell-Leukämie-Zelllinien beschrieben (Sawyers 1991).

Eine Deletion der Region 7q21-34 tritt bei AML, Myelodysplasie und verschiedenen soliden Tumoren auf. Möglicherweise liegt in dieser Region ein unbekanntes Tumorsuppressorgen (Solomon 1991).

### 1.3 Transkriptionsinitiation proteincodierender Gene in Eukaryoten

Die Expression eines Gens beginnt mit der Transkription des DNA-Abschnittes in RNA durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase. Nukleäre Gene werden in Eukaryoten durch die RNA-Polymerasen I, II und III (Pol I, II und III) transkribiert. Diese drei Polymerasen unterscheiden sich in ihrer Funktion: Pol I transkribiert die Gene für ribosomale RNA (28S, 18S und 5,8S rRNA); Pol II transkribiert alle proteincodierenden Gene (mRNA) sowie einige "small nuclear RNAs" (snRNA); Pol III transkribiert die Gene für Transfer-RNAs (tRNA), für 5S rRNA und weitere snRNAs (McKnight 1996). Der Weg vom Gen zum Protein führt von der Transkription einer Prä-mRNA über den Prozeß des Spleißens und der Formierung des 3'-Poly(A)-Terminus zunächst zur reifen mRNA, die aus dem Zellkern ins Cytoplasma ausgeschleust wird. An den Ribosomen nehmen mRNA und tRNA über Codon-Anticodon-Wechselwirkung Kontakt miteinander auf. Unter Ausbildung einer Peptidbindung zwischen den Aminosäuren benachbarter tRNAs wird das Protein synthetisiert (Knippers 1997).

Für eine selektive und spezifische Initiation der Transkription an doppelsträngiger DNA sind neben der RNA-Polymerase II noch zusätzliche Proteine notwendig, die als Allgemeine Transkriptionsfaktoren (General Transcription Factors, GTF) bezeichnet werden, sowie bestimmte DNA-Sequenz-Motive (Core-Promotor-Sequenz). Im folgenden sollen die an der

Initiation der Transkription proteincodierender Gene beteiligten Faktoren sowie deren Funktion und Regulationsmöglichkeiten genauer betrachtet werden.

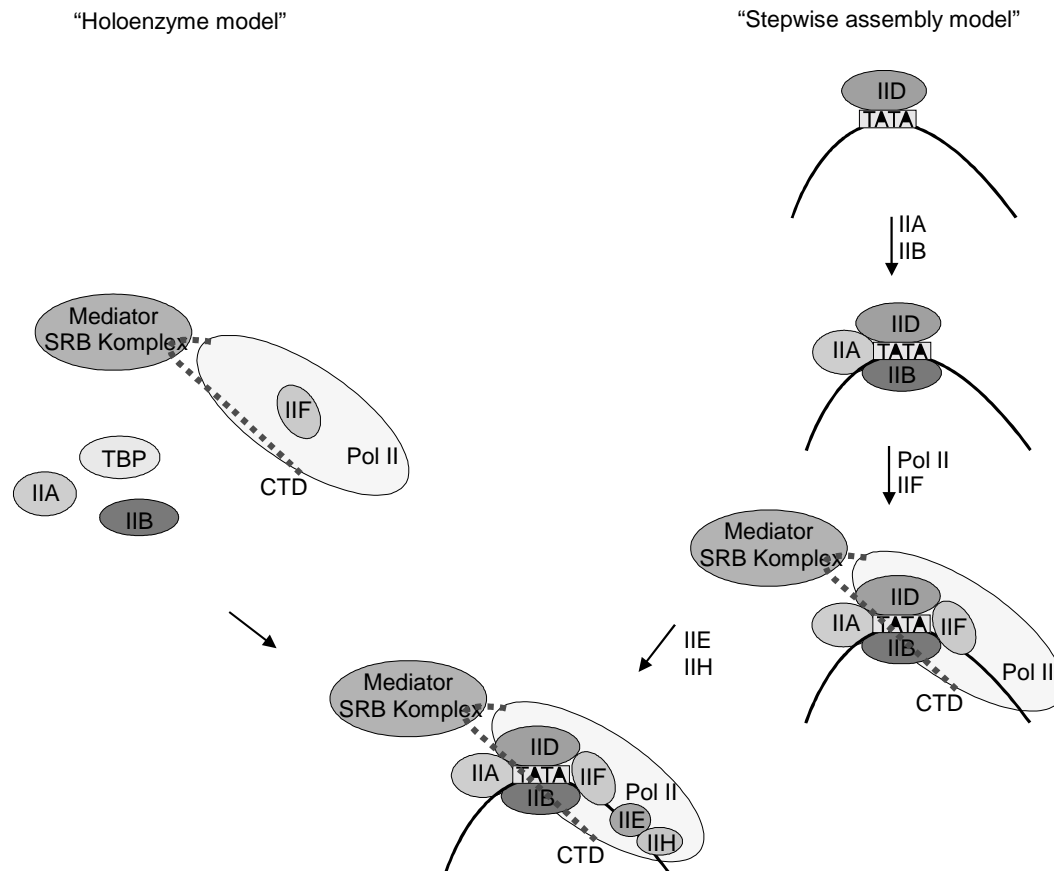


Abbildung 2: Modell der Transkriptionsinitiation: "Stepwise assembly"-Modell vs. Holoenzym (nach Orphanides *et al.* 1996)

### 1.3.1 Allgemeine Transkriptionsfaktoren (GTFs)

Durch Chromatographie von Zellextrakten konnten Proteinfaktoren isoliert und identifiziert werden, die sich *in vitro* schrittweise an der Promotor-Sequenz anlagern, Pol II rekrutieren und eine basale Transkription *in vitro* ermöglichen.

Das Modell des schrittweisen Aufbaus dieses Komplexes, das aus in-vitro-Beobachtungen erstellt wurde, postuliert das separate Vorliegen der einzelnen GTFs, die sich erst an der Promotor-DNA zusammenlagern. Folgender Ablauf wird beschrieben (Orphanides *et al.* 1996):

1. Erkennung von Core-Promotor-Elementen durch TFIID
2. Erkennung des TFIID-Promotor-Komplexes durch TFIIB
3. Rekrutierung eines TFIIF/Pol II-Komplexes
4. Vervollständigen des Präinitiationskomplexes durch Binden von TFIIE und TFIIH

5. Denaturierung (melting) des Promotors und Bildung eines "offenen" Initiationskomplexes
6. Synthese der ersten Phosphordiesterbindung des mRNA-Transkriptes
7. Lösen der Verbindung von Pol II mit dem Promotor (promoter clearance)
8. Verlängerung des RNA-Transkriptes

TFIIA kann auf jeder Stufe dieses Modells nach Bindung von TFIID an den Promotor in den Komplex eintreten.

Durch den Nachweis eines Proteinkomplexes (RNA-Polymerase-II-Holoenzym) in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bestehend aus den Hefehomologen der Transkriptionsfaktoren TFIIB, TFIIF und TFIIH, Pol II sowie SRB-Proteinen (suppressor of RNA polymerase B) wurde dieses Modell für die *in-vivo*-Situation jedoch in Frage gestellt (Koleske & Young 1994). Auch in Säugerzellen konnten ähnliche Komplexe gefunden werden (Ossipow *et al.* 1995; Maldonado *et al.* 1996). Da allerdings das Modell des sequenziellen Aufbaus des Initiationskomplexes das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren durch Protein-Protein-Wechselwirkung gut verdeutlicht, soll es für die folgende Darstellung der einzelnen GTFs zugrunde gelegt werden:

**TFIID:** Der Faktor TFIID besteht aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) und den TBP-assoziierten Faktoren (TAF<sub>II</sub>s).

TBP erkennt mit seinem Carboxy-Terminus die TATA-Box eines Promotors und bindet unter Änderung seiner Konformation und Distorsion der DNA (Conaway & Conaway 1993). Die Struktur des TBP ähnelt einem Sattel, dessen untere konkave Fläche den Kontakt zur DNA herstellt und dessen obere Konvexität Raum für Proteinkontakte bietet (Buratowski 1994).

Zusätzlich zu TBP enthält TFIID noch wenigstens acht weitere Untereinheiten, die TBP-assoziierten Faktoren (TAF<sub>II</sub>s). Über die Organisation des TBP und der TAF<sub>II</sub>s innerhalb des TFIID-Komplexes ist wenig bekannt. Die größte TAF<sub>II</sub>-Untereinheit (hTAF<sub>II</sub>250) steht vermutlich mit der Oberfläche des TBP in Verbindung und ist möglicherweise für die Bindung der restlichen TAF<sub>II</sub>s an TBP verantwortlich. Es gibt Hinweise auf eine Histon-Oktamer-ähnliche Struktur innerhalb des TFIID-Komplexes (Burley & Roeder 1996; Orphanides *et al.* 1996).

Eine Funktion der TAF<sub>II</sub>s wird in der Rolle sogenannter Coaktivatoren gesehen: Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren) treten über ihre Transaktivierungsdomäne in Kontakt zu bestimmten TAF<sub>II</sub>s, die so eine Verbindung zu dem basalen Transkriptionskomplex herstellen. Als Beispiel hierfür ist die Interaktion zwischen der glutaminreichen Aktivierungsdomäne des Faktors Sp1 und TAF<sub>II</sub>110 genannt. Gestützt wird diese Hypothese durch

die Beobachtung, daß die *in-vitro*-Transkription in Gegenwart von TFIID, aber nicht von gereinigtem TBP, durch sequenzspezifische Aktivatoren stimuliert werden kann (Tanese & Tjian 1993; Tjian & Maniatis 1994). TAF<sub>II</sub>s werden außerdem eine Rolle in der Promotorerkennung zugeschrieben aufgrund der Tatsache, daß TFIID in Footprinting-Experimenten einen DNA-Abschnitt von der TATA-Box bis zu Sequenzen stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts besetzt, während TBP-Bindung in diesen Experimenten auf eine 20-bp-Region über der TATA-Box beschränkt ist. Des weiteren ist bekannt, daß der TFIID-Komplex die Transkription an TATA-freien Promotoren ermöglicht, während TBP allein dazu nicht in der Lage ist (Conaway & Conaway 1993; Tjian & Maniatis 1994). Es gibt Hinweise auf die Erkennung des Initiator-Elementes oder eines "downstream promoter element" (DPE) durch TAF<sub>II</sub>s (Burke & Kadonaga 1996).

TFIIB: TFIIB besitzt Bindestellen für den TFIID-DNA-Komplex, TFIIF und RNA-Polymerase II, was die Funktion von TFIIB als Bindeglied zwischen dem Promotor-gebundenem TFIID und dem TFIIF/Pol II-Komplex ermöglicht. Darüber hinaus wird durch Interaktion von TFIIB und Pol II der exakte Startpunkt der Transkription festgelegt (Conaway & Conaway 1993; Orphanides *et al.* 1996). TFIIB interagiert sequenzspezifisch mit dem unmittelbar stromaufwärts des TATA-Elementes gelegenen "IIB recognition element" (BRE) und bindet hier in der großen Grube der DNA-Helix (Lagrange *et al.* 1998).

TFIIA: Wie auch TFIIB kann TFIIA an den TBP-DNA-Komplex binden (Buratowski *et al.* 1989) und steigert damit die Affinität von TBP für das TATA-Element (Imbalzano *et al.* 1994). Die Frage, ob TFIIA ein essentieller Faktor für die Initiation der Transkription ist, wurde kontrovers diskutiert, da in Abhängigkeit von der Reinheit des jeweiligen *in vitro* verwendeten Transkriptionssystems der Faktor TFIIA entweder essentiell, stimuliert oder verzichtbar war. Für eine basale Transkriptionsaktivität mit hochreinen Faktoren *in vitro* wird TFIIA nicht benötigt (Conaway & Conaway 1993). Eine Erklärung hierfür ist die Fähigkeit von TFIIA, den Effekt von Repressoren der Transkription aufzuheben, die in Abhängigkeit von der Reinheit der Faktoren des jeweiligen Systems vorliegen können. Für die aktivierte Transkription *in vitro* als Antwort auf Aktivatoren ist der Faktor TFIIA unerlässlich (Orphanides *et al.* 1996).

TFIIF: Die Rekrutierung von RNA-Polymerase II in den Initiationskomplex wird durch TFIIF erheblich stimuliert. TFIIF bildet mit der Polymerase *in vitro* einen Komplex, der vermutlich über Wechselwirkung zwischen der kleineren der beiden TFIIF-Untereinheiten und TFIIB mit

dem Initiationskomplex assoziiert. TFIIF beeinflusst darüber hinaus auch die Elongation der Transkription (Buratowski 1994).

TFIIE: Dem Faktor TFIIE werden zwei zeitlich getrennte Funktionen in der Transkriptionsinitiation zugeschrieben: Zum einen greift TFIIE durch Wechselwirkung mit TBP in einen frühen Schritt in der Bildung des Initiationskomplexes ein, zum anderen ist TFIIE an der Rekrutierung von TFIIH beteiligt. TFIIE ist das Ziel regulatorischer Proteine wie Jun/Fos, so daß ihm möglicherweise eine Rolle in Aktivierung oder Repression der Transkriptionsinitiation zukommt (Yokomori *et al.* 1998).

Der Faktor TFIIE bindet in Lösung mit hoher Affinität an RNA-Polymerase II und tritt entweder im Anschluß oder gleichzeitig mit dem TFIIF-Polymerase-Komplex in den Initiationskomplex ein. Dieser Schritt ist Voraussetzung für die Rekrutierung von TFIIH (Flores *et al.* 1990). TFIIE stimuliert zudem die CTD-Kinase-Aktivität von TFIIH (Orphanides *et al.* 1996).

TFIIH: Der Faktor TFIIH besteht aus verschiedenen Untereinheiten, die Kinase- und Helikaseaktivität besitzen und an der Nukleotid-Exzisionsreparatur von DNA-Schäden mitwirken (Rossignol *et al.* 1997). Die DNA-Reparatur in transkribierten Genen läuft schneller ab als in nicht transkribierten Genen (Mellon & Hanawalt 1989). Wahrscheinlich kommt TFIIH eine zentrale Stellung in dieser Kopplung von Transkription und DNA-Reparatur zu (Orphanides *et al.* 1996).

In allen eukaryotischen Pol-II-Enzymen trägt die größte Untereinheit als sogenanntes "Repeat" multiple Kopien eines Heptapeptids an ihrem Carboxylende (carboxy-terminal domain, CTD; Corden *et al.* 1985). Diese Region ist vor der Initiation der Transkription hypophosphoryliert (Pol-IIa-Form), während der Elongation aber hyperphosphoryliert (Pol-IIo-Form). Verschiedene cyclinabhängige Proteinkinasen (cyclin-dependent kinase, CDK) erkennen die CTD als Substrat. Die mit dem SRB-Komplex und dem Transkriptionsfaktor TFIIH assoziierten CDKs sind offenbar potentiell wichtige Regulatoren des Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II (McKnight 1996). Cdk7 ist eine Kinase, der eine Rolle im Zellzyklus zugeschrieben wird und die Teil des CAK-Komplexes (cdk-activating kinase) ist. Als Bestandteil von TFIIH verschiebt sich die Substratspezifität von CAK zugunsten der CTD der RNA-Polymerase II (Rossignol *et al.* 1997). TFIIH phosphoryliert außerdem TFIIE und TFIIF, wozu freies CAK nicht in der Lage ist (Yankulov & Bentley 1997). Die Beobachtung, daß CAK eigenständig in der Zelle vorliegt und eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt, aber auch in TFIIH reinkorporiert werden kann und so die Transkription stimuliert, führte zu der Hypothese, daß freies CAK im Gleichgewicht mit

TFIIH vorliegt und einen Mechanismus für die Regulation des TFIIH im Zellzyklus, in der Transkription und in der DNA-Reparatur darstellt (Rossignol *et al.* 1997).

### 1.3.2 Core-Promotor-Elemente

In der unmittelbaren Umgebung des Transkriptionsstartes werden häufig folgende DNA-Sequenzmotive gefunden, denen eine funktionelle Bedeutung am Aufbau des Initiationskomplexes durch sequenzspezifische Bindung von Faktoren zukommt:

TATA-Box: Viele Promotoren eukaryotischer Gene zeigen in einer Region von etwa 25-30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes eine A/T-reiche Sequenz. Diese sogenannte TATA-Box hat die Konsensussequenz T-A-T-A-A/T-A-A/T und wird durch das TATA-Binding-Protein (TBP) erkannt und gebunden (Orphanides *et al.* 1996).

”IIB recognition element” (BRE): Unmittelbar stromaufwärts der TATA-Box bindet TFIIB sequenzspezifisch an einem ”IIB recognition element” mit der Konsensussequenz G/C-G/C-G/A-C-G-C-C. Diese Bindung an DNA findet sowohl in Gegenwart von TBP als auch ohne TBP statt, so daß eine direkte Wechselwirkung zwischen TFIIB und diesem Sequenzelement anzunehmen ist. Im Gegensatz dazu findet eine Bindung von TFIIB an DNA stromabwärts der TATA-Box nur in Gegenwart von TBP statt, was durch die durch TBP induzierte Konformationsänderung der DNA erklärt wird (Lagrange *et al.* 1998).

Initiator-Element (Inr): Das Initiator-Element mit der Konsensussequenz (Py)<sub>2</sub>-C-A-(Py)<sub>5</sub>- wurde als einfachster funktionierender Promotor zunächst für das *TdT*-Gen beschrieben, dessen Promotor keine klassische TATA-Box enthält. Es ermöglicht eine Transkriptionsinitiation mit definiertem Transkriptionsstart auf niedrigem Niveau, die in Gegenwart einer TATA-Box oder Sp1-Bindestellen gesteigert wird. Transkriptionsstartpunkt ist das innerhalb des Initiator-Elementes gelegene Adeninnukleotid (Smale & Baltimore 1989). Verschiedene Faktoren wie YY1 (Usheva & Shenk 1994) und USF (Du *et al.* 1993) können mit dem Initiator-Element interagieren.

CT-Signal: Etwa sieben Nucleotide stromabwärts des Transkriptionsstarts findet sich in eukaryotischen Promotoren häufig ein CT-Signal mit der Konsensussequenz C-T-N-C-N-G (Larsen *et al.* 1995).

”Downstream promoter element” (DPE): In TATA-Box-freien *Drosophila*-Promotoren wird ein etwa 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts gelegenes ”downstream promoter element” (DPE) mit der Konsensussequenz A/G-G-A/T-C-G-T-G beschrieben. Ein DPE ist

auch in menschlichen Zellen konserviert (Burke & Kadonaga 1997). In Verbindung mit dem Initiator-Element kann DPE als Bindestelle für TFIID dienen (Burke & Kadonaga 1996).

### 1.3.3 Regulation der Transkription

Innerhalb der Zelle ist die Transkription ein streng regulierter Prozeß. Die Verpackung der DNA in Chromatin sowie allgemeine oder genspezifische Repressorproteine unterdrücken die Genexpression. Allein durch Mechanismen der Derepression kann die Transkription beträchtlich gesteigert werden. Durch Aktivatorproteine, die spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen binden, wird die Transkription getriggert und die Expression eines einzelnen Gens oder einer Gruppe von Genen induziert. Die *in vitro* beobachtete, von regulatorischen Faktoren unabhängige "basale" Transkription findet *in vivo* praktisch nicht statt. Aktivatoren können an verschiedenen Schritten der mRNA-Synthese angreifen (Orphanides *et al.* 1996):

1. Entfernen von Repressoren von der Promotor-DNA (z. B. SWI/SNF-vermittelte Chromatinstrukturänderung)
2. Rekrutierung von Allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs) und RNA-Polymerase II an einem Promotor
3. Induktion von Konformationsänderungen im Initiationskomplex
4. Induktion kovalenter Modifikationen der Proteine des Initiationskomplexes (z. B. Phosphorylierung der CTD der Polymerase)
5. Stimulation der "promoter clearance" und Elongation

#### 1.3.3.1 Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren als Aktivatoren der Transkription

Transkriptionsfaktoren (Aktivatorproteine), die stromaufwärts der Core-Promotor-Elemente eines Gens an sogenannte Upstream-Promotor-Elemente binden, spielen eine wesentliche Rolle sowohl für die konstitutive, als auch für die induzierbare, entwicklungsabhängige und gewebsspezifische Genexpression. Über eine DNA-Bindedomäne (Helix-turn-helix-Motiv, POU-Domäne, Cystein-Histidin-Zink-Finger-Motiv, Multi-Cystein-Zink-Finger-Motiv, basische DNA-Bindedomäne, Fork-head-Motiv, ETS-Motiv) wird eine sequenzspezifische Bindung des Faktors an DNA ermöglicht. Die Aktivierungsdomäne (saure, glutaminreiche oder prolinreiche Domäne) des Transkriptionsfaktors vermittelt über Interaktion mit dem Initiationskomplex eine Steigerung der Transkription. Einige Faktoren besitzen außerdem eine Di-



merisierungsdomäne (Leucinzipper) oder eine Hormon-Bindedomäne, die für die Aktivität des Transkriptionsfaktors von Bedeutung sind. Zwischen den Aktivierungsdomänen von Aktivatorproteinen und den Allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs) werden vielfältige Protein-Protein-Wechselwirkungen beschrieben (Latchman 1995a).

Da die Interaktionen zwischen Aktivatoren und den für eine basale Transkription nötigen Faktoren offenbar für eine aktivierte Transkription nicht ausreichend sind, wurden in der Coaktivatorhypothese Faktoren postuliert, die eine Mittlerrolle übernehmen (Tjian & Maniatis 1994). Als Coaktivatoren werden TAF<sub>II</sub>s als Bestandteil von TFIID und TFIIA bezeichnet, die für eine aktivierte Transkription notwendig sind; z. B. bindet Sp1 mit seiner glutaminreichen Aktivierungsdomäne an TAF<sub>II</sub>110 (Tjian & Maniatis 1994).

In Hefe wurde ein Mediator bestehend aus 20 Untereinheiten beschrieben, der essentiell für eine aktivierte Transkription *in vitro* in einem System mit gereinigten basalen Transkriptionsfaktoren ist. Dieses Mediatorprotein wurde assoziiert mit RNA-Polymerase II als Holoenzym isoliert. Eine weitere Funktion kommt dem Mediator in der Steigerung der Aktivität der basalen Transkription sowie in der Stimulation der Phosphorylierung der CTD der RNA-Polymerase II durch die TFIIH-assoziierte CTD-Kinase zu (Kim *et al.* 1994).

### 1.3.3.2 Repression der Transkription

Einige Transkriptionfaktoren bewirken eine Inhibition der Transkription. Diese als Repressoren bezeichneten Faktoren besitzen wie Aktivatoren eine DNA-Bindedomäne. Die Repressor-Domäne hat keine einheitliche Struktur, wie auch die Angriffspunkte der Repressoren vielfältig sind (Johnson 1995).

Der Repressoreffekt kann entweder indirekt durch Behinderung der Funktion eines Aktivators oder direkt durch Reduktion der Aktivität des basalen Transkriptionskomplexes vermittelt werden. Durch die Bindung eines Repressorproteins an DNA kann ein Aktivator an der Bindung an eine überlappende DNA-Bindestelle gehindert werden, so daß die Aktivatorfunktion durch kompetitive DNA-Bindung des Repressors inhibiert wird und eine Repression des entsprechenden Gens resultiert. Ein Repressor kann auch gemeinsam mit einem Aktivator an DNA binden und durch Maskierung (quenching) der Aktivierungsdomäne den Aktivatoreffekt aufheben. Repressoren können außerdem entweder den Aufbau des basalen Transkriptionskomplexes hemmen oder seine Aktivität und Stabilität reduzieren (Johnson 1995; Latchman 1995a).

### 1.3.3.3 Transkription und Chromatinstruktur

Da DNA in eukaryotischen Zellen nicht als nackter DNA-Doppelstrang sondern in Form von Chromatin vorliegt, stellt sich die Frage, wie die *in vitro* gemachten Beobachtungen zum Ablauf der Transkription durch Chromatin modifiziert werden und welche Rolle dem Chromatin in der Genregulation zukommt.

Die Verpackung eines Gens in Chromatin führt zur Repression der Transkription, und eine der Funktionen von Aktivatoren besteht darin, diese Repression aufzuheben (Kadonaga 1998).

Als ein Bindeglied zwischen Transkription und Chromatinmodifizierung wird das RNA-Polymerase-II-Holoenzym betrachtet. Im Hefe-Holoenzym sowie in einem der heterogenen Säugerzell-Holoenzymkomplexe wird Swi/Snf als eine Untereinheit beschrieben (Struhl 1996; Cho 1998). Der Swi/Snf-Komplex ist als DNA-stimulierte ATPase in der Lage, die Anordnung der Nucleosomen zu verändern und so die Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA zu erleichtern. *In vivo* kommt dem Swi/Snf-Komplex allerdings nur für die Transkription einiger Gene Bedeutung zu (Struhl 1996). Die Abhängigkeit der Transkription eines Gens von der Swi/Snf-Funktion ist möglicherweise mit der Stärke des Promotors invers korreliert: Schwache Promotoren benötigen Swi/Snf, während starke Promotoren in ihrer Funktion unabhängig von Swi/Snf sind (Kadonaga 1998).

Ein weiterer Mechanismus der Chromatinmodifikation, der im Zusammenhang mit Transkriptionsaktivität beobachtet wurde, ist die posttranslationale und reversible Acetylierung von Lysin-Seitenketten der Histone durch Histon-Acetyltransferasen (HATs). Diese Acetylierung reduziert die positive Ladung der Histone und damit deren Affinität für DNA, was in einer besseren Zugänglichkeit der in Chromatinstruktur organisierten DNA für Transkriptionsfaktoren resultiert. Es besteht eine positive Korrelation zwischen Histon-Acetylierung und Genaktivität, aber HATs erkennen auch die Transkriptionsfaktoren TFIIE und TFIIIF, p53 und HMG-Proteine als Substrat, so daß ihre Bedeutung möglicherweise über die Histon-Acetylierung hinausgeht. Die Deacetylierung erfolgt durch Histon-Deacetylasen (HDACs), die als Komplex mit Corepressoren an der Repression entsprechender Gene mitwirken (Grunstein 1997; Kuo 1998; Kadonaga 1998).

### 1.3.3.4 DNA-Methylierung und Genexpression

Eine häufige Modifikation der DNA in höheren Eukaryoten ist die Methylierung des Cytosins, die in Säugerzellen 2-7% der Cytosine betrifft. Von diesen methylierten Cytosinen finden sich

etwa 90% in CG-Basenfolgen. Methylierte DNA nimmt in der Zelle eine DNase-I-insensitive Struktur ein, die typisch für inaktive Gene ist, während unmethylierte DNA eine DNase-I-sensitive Struktur einnimmt (Latchman 1995b).

Methylierung findet sowohl als *de-novo*-Methylierung von unmethylierter DNA, als auch als Hemimethylierung am neusynthetisierten und damit unmethylierten Strang nach Zellteilung statt. Diese Methylierungsreaktionen werden durch die DNA-Methyltransferase und möglicherweise eine weitere *de-novo*-Methyltransferase katalysiert. Auch die Demethylierung ist ein aktiver enzymatischer Prozeß und scheint eine wesentliche Rolle in der gewebspezifischen Aktivierung von Genen während der Entwicklung zu spielen (Mostoslavsky 1997).

Der Grad der DNA-Methylierung im Genom korreliert mit der Genexpression: Gewebsspezifisch exprimierte Gene liegen in der Regel in den Zellen unmethyliert vor, in denen sie exprimiert werden, während sie in den übrigen Zellen methyliert sind. Haushaltsgene (housekeeping genes), die eine CpG-reiche Region besitzen und konstitutiv exprimiert werden, sind in allen Geweben unmethyliert. Für Differenzierung und Entwicklung scheint die DNA-Methylierung eine wichtige Rolle zu spielen. Auch im Rahmen der Krebsentstehung finden sich häufig Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA wie Methylierung von Tumorsuppressorgenen und Demethylierung von Oncogenen (Mostoslavsky 1997).

#### 1.4 Experimentelle Untersuchung von Promotorsequenzen mit Hilfe von Reporter-gen-Assays

Mit Hilfe von Reporter-genassays ist es möglich, den Einfluß potentieller Promotoren und Enhancer auf die Transkription eines Reportergens in geeigneten Zellen zu testen. Reportergene codieren für Proteine, die durch enzymatische Aktivität oder eine andere Eigenschaft leicht nachweisbar sind. Idealerweise werden sie nicht oder nur in geringem Umfang in eukaryotischen Zellen endogen exprimiert. Häufig als Reporter verwendet werden das Chloramphenicol-Acetyltransferase-(CAT)-Gen aus *E. coli*, das  $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*) aus *E. coli*, das Gen für menschliches Wachstumshormon (*hGH*) und das Luciferase-Gen (*luc*) aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (Alam & Cook 1990; Neurath *et al.* 1997).

Das potentielle Promotorfragment wird in richtiger Orientierung vor das Reportergen kloniert und der Vektor in geeignete Zellen transfiziert. Die Aktivität des Reporter-genprodukts ist im allgemeinen direkt proportional der Transkriptionsaktivität. Durch Nachweis des vom Reportergen codierten Proteins läßt sich deshalb indirekt eine Aussage über den Einfluß des Pro-

motorfragmentes auf die Transkription des nachgeschalteten Gens machen (Alam & Cook 1990).

Es existiert eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Vektoren, denen aber meist folgende Grundelemente gemeinsam sind (Maniatis *et al.* 1989; Alam & Cook 1990):

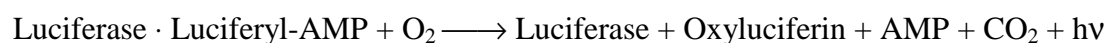
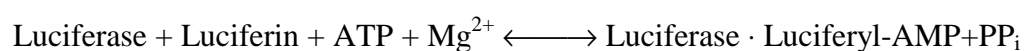
- ein Reportergen mit Polyadenylierungssignal
- eine "multiple cloning site" stromaufwärts des Reportergens
- ein Polyadenylierungssignal stromaufwärts der "multiple cloning site", um kryptische Promotoraktivität innerhalb der Plasmidsequenz zu unterdrücken
- ein Intron, das für die effiziente Produktion reifer cytoplasmatischer RNA in einigen Vektoren erforderlich ist
- ein bakterieller Replikationsursprung (ori) und ein Antibiotikaresistenzgen, um den Vektor in Bakterien amplifizieren zu können

Als negative Kontrolle dient in der Regel der entsprechende Reportergenvektor ohne Promotor- und Enhancerelement. Ein positiver Kontrollvektor enthält ein Promotor/Enhancerelement, das in verschiedenen Zelltypen starke Transkriptionsaktivität induziert, z. B. der frühe Promotor des SV40-Virus. Kontrollvektoren dienen als Maßstab der Transkriptionseffizienz, bieten einen Vergleich der Stärke der Testsequenz in Relation zu einem bekannten Promotor und ermöglichen die Bestimmung der Hintergrundaktivität des Reportervektors (Alam & Cook 1990).

### 1.4.1 Luciferase-Assay

Das Luciferase-Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (firefly luciferase) ist ein monomeres Protein (62 kDa), das keiner posttranslationalen Prozessierung unterliegt. Das Luciferase-Gen (*luc*) wurde von de Wet *et al.* (1987) sequenziert und kloniert.

Luciferase katalysiert die Umsetzung des Substrates Luciferin in Gegenwart von ATP und  $Mg^{2+}$  zu Luciferyl-AMP, das in einem zweiten Schritt unter Freisetzung von Licht (560 nm) zu Oxyluciferin reagiert:



Wenn ein Substratüberschuß vorliegt, ist die Stärke des emittierten Lichtblitzes proportional der Luciferase-Aktivität. Zur Detektion des Lichtes kann ein Luminometer oder ein Flüssigszintillationszähler verwendet werden.

Nachteil des konventionellen Protokolls ist die kurze Dauer des Lichtblitzes ( $<1$  s) und die Hemmung des Enzyms durch das entstehende Reaktionsprodukt Oxyluciferin (Bronstein *et al.* 1994)

In einem von Promega entwickelten Luciferase-Assay-System wird durch die Gegenwart von Coenzym A eine günstigere Reaktionskinetik erzielt, so daß eine über etwa 20 Sekunden konstante Lichtproduktion entsteht, die langsam abnimmt und eine Halbwertszeit von ca. 5 Minuten hat. Linearität des Assays ist über acht Größenordnungen zu erzielen: Im Konzentrationsbereich von 10 pg/l ( $10^{-16}$  M) bis 1 mg/l ( $10^{-8}$  M) ist die Luciferasekonzentration proportional der Lichtintensität. (Neurath 1997). Die Sensitivität des Luciferase-Assays ist 10-1000 mal größer als die des CAT-Assays (Thompson *et al.* 1990).

#### 1.4.2 $\beta$ -Galactosidase-Assay

Das durch das *lacZ*-Gen codierte bakterielle Enzym  $\beta$ -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse verschiedener  $\beta$ -Galactoside.  $\beta$ -Galactosidase wird in unterschiedlichem Maß in Säugerzellen exprimiert, so daß die Anwendbarkeit des  $\beta$ -Galactosidase-Assays von der endogenen Expression von  $\beta$ -Galactosidase in der verwendeten Zelllinie abhängig ist.

Die Enzymaktivität kann mit Hilfe verschiedener Substrate photometrisch, fluorometrisch, luminometrisch und histochemisch nachgewiesen werden. Häufig verwendet wird ein Protokoll, das photometrisch o-Nitrophenol als Produkt der Spaltung des Substrates ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) durch  $\beta$ -Galactosidase nachweist. Nachteil dieses Verfahrens ist eine niedrige Sensitivität. Ein Chemilumineszenzassay unter Verwendung von 1,2-Dioxetan-Substrat ist etwa 50 000fach sensitiver, aber auch hier ist die Anwendbarkeit durch mögliche endogene Enzymaktivitäten in den Zellen begrenzt.

Es wurden Vektoren entwickelt, die das *lacZ*-Gen unter Kontrolle eines viralen Promotors enthalten und häufig als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz bei Reporter-Gen-Assays (Cotransfektion) verwendet werden. (Alam & Cook 1990; Bronstein *et al.* 1994).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurde in vorausgegangenen Arbeiten das *Fre2*-Gen als weitere Integrationsstelle des F-MuLV isoliert und analysiert (Pass 1995; Eisel 1997). In einer von D. Eisel (1997) beschriebenen Sequenzanalyse der Promotor-Region konnten keine klassischen Promotorelemente und kein Initiatorelement, jedoch einige GC-Boxen gefunden werden.

Ziel dieser Arbeit sollte nun der experimentelle Nachweis einer Promotorfunktion in diesem DNA-Abschnitt sein, der unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des murinen *Fre2*-Gens liegt. Durch Klonierung dieses Promotors in einen Luciferase-Reportergen-Vektor und Durchführung eines Luciferase-Assays sollte untersucht werden, ob eine funktionelle Aktivität vorhanden ist. Weitere Sequenzanalysen des Promotorbereiches sollten zur Identifikation möglicher Bindestellen sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren (Upstream-Promotor-Elemente) führen.

In weiteren Versuchen sollte eine geeignete DNA-Sonde aus dem bisher nur auf cDNA-Ebene vorliegenden Exon 3 des *Fre2*-Gens gefunden werden, die sich für eine Colony-Hybridisierung einer genomischen Cosmidbank eignet.

## 2 Methoden<sup>1</sup>

### 2.1 Arbeiten mit DNA

#### 2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis 1986) wurden die beiden Fragmente aus der vermuteten Promotorregion des *Fre2*-Gens aus einem  $\lambda$ -Phagen-Klon amplifiziert, der ein 16-kb-Insert der *Fre2*-Sequenz enthält. Nach entsprechender Aufarbeitung der DNA wurden diese Fragmente in einen Luciferase-Reportergen-Vektor kloniert.

Eine weitere PCR wurde durchgeführt, um das Exon 3 des *Fre2*-Gens aus einem cDNA-Klon zu amplifizieren. Nach Markierung mit <sup>32</sup>P bzw. Digoxigenin wurde das PCR-Produkt als Sonde in einer Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

Die Standardreaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt: 10  $\mu$ l 10 x PCR-Puffer, 1  $\mu$ l dNTP-Mix (25 mM), 1  $\mu$ l je Primer (50  $\mu$ M), 10 ng DNA und 1  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (5 u/ $\mu$ l) wurden auf Eis zusammenpipettiert, mit H<sub>2</sub>O auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und das Reaktionsgemisch mit einem Tropfen Paraffin überschichtet. In einem Wasserbad-Thermocycler wurden nun 25-30 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 1 min 94°C, 1 min Annealingtemperatur (abhängig vom jeweiligen Primerpaar), 3 min 72°C. Vorgeschaltet wurde ein einmaliges Erhitzen auf 94°C für 2 min, um ein vollständiges Denaturieren der DNA-Doppelstränge zu gewährleisten.

Die optimale Annealing-Temperatur des Primers läßt sich wie folgt abschätzen, muß aber bei Problemen experimentell ermittelt werden:

$$T = (\text{Anzahl der Basen G und C}) \times 4^{\circ}\text{C} + (\text{Anzahl der Basen A und T}) \times 2^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$$

---

<sup>1</sup> Die zur Erstellung dieser Arbeit angewendeten molekularbiologischen Standardmethoden entstammen, wenn keine andere Quelle angegeben wurde, den Laborhandbüchern 'Molecular Cloning' (Maniatis et al. 1989) und 'Current Protocols In Molecular Biology' (Ausubel et al. 1989).

### 2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese von DNA-Fragmenten in Agarosegelen diente der Auftrennung nach ihrer Molekülgröße (Johnson & Grossmann 1977). Durch Anfärben des Gels mit dem fluoreszierenden Ethidiumbromid, das zwischen die Basen der DNA-Moleküle interkaliert, erkannte man nach Anregung im UV-Licht DNA-Banden, die durch Vergleich mit Längenstandards aufgrund ihrer Wanderungstrecke identifiziert werden konnten.

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8% und 2% verwendet. Die Agarose wurde in der entsprechenden Menge TAE- oder TBE-Puffer durch Kochen in einem Mikrowellengerät gelöst, mit 100 ng/ml Ethidiumbromid versetzt und nach Abkühlen auf ca. 60°C auf einen horizontalen Gelträger gegossen. Am oberen Ende des Gels entstanden durch einen eingesteckten Kamm Taschen für das Auftragen der Proben. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer mit dem entsprechenden TAE- oder TBE-Laufpuffer gelegt. Die Ethidiumbromidkonzentration des Laufpuffers war identisch mit der des Gels. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und für 5 min auf 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu zerstören, die das Laufverhalten beeinträchtigen würden. Der Ladepuffer enthielt die Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau, die während des Gellaufs eine farbige Bande bildeten und einen Rückschluß auf die Wanderungstrecke der DNA-Fragmente erlaubten. Der Gellauf erfolgte bei einer angelegten Feldstärke von ca. 5 V/cm.

### 2.1.3 DNA-Elution aus Agarosegelen

#### 2.1.3.1 Elution durch Adsorption der DNA an Glaspulver

Um DNA aus Agarosegelen zu eluieren, wurde als Standardverfahren die Adsorption an Glaspulver verwendet. Diese Methode nutzt die Eigenschaft von DNA, in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen reversibel an Glaspartikel zu binden und nach Absenken des Salzgehaltes wieder in Lösung zu gehen (Vogelstein und Gillespie 1979).

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden zunächst in einem Agarosegel mit TAE-Puffer aufgetrennt und ausgeschnitten. Das Gelblockchen wurde gewogen und mit 2 ml gesättigter NaJ-Lösung bei 50°C für 10 min inkubiert. Das Gel verflüssigte sich, und die DNA ging in



Lösung. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurde nun 1 mg Glaspulver aus einer zuvor auf  $94^\circ\text{C}$  erhitzten Glaspulversuspension zugegeben. Um eine Bindung der DNA an die Glaspartikel zu ermöglichen, folgte nun für eine Stunde eine Inkubation bei Raumtemperatur auf einem rotierenden Rad, das für kontinuierliche Durchmischung sorgte. Danach wurden die Glaspartikel mit der daran adsorbierten DNA durch Zentrifugation bei 13000 g für zwei Minuten sedimentiert. Das Glassediment wurde dreimal mit einer eiskalten Mischung aus 50% Ethanol und 1 x TNE gewaschen. Die DNA wurde nun mit TE-Puffer pH 8,0 bei 10-minütiger Inkubation bei  $50^\circ\text{C}$  von den Glaspartikeln abgelöst. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, der Überstand abpipettiert, gesammelt und noch einmal bei 13000 g abzentrifugiert, um verbliebene Glaspartikel zu entfernen.

### 2.1.3.2 Elution mit dem UV-Band-Elutor

Für die Isolierung kleiner DNA-Fragmente mit einer Größe unter 200 bp wurde die Elution mittels UV-Band-Elutor gewählt, da hier andere Methoden, die eine Adsorption der DNA voraussetzen, eine sehr geringe Ausbeute an isolierter DNA aufweisen.

Zuerst wurde ein 2%iges Agarosegel mit TAE-Puffer, dem  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid zugesetzt wurden, auf einem UV-durchlässigen Gelträger gegossen. In das Gel wurden zwei Kämme eingebracht, die nach der Polymerisation der Agarose Auftrags- und Fangtaschen zurückließen. Das Gel wurde mit dem Gelträger in den UV-Band-Elutor (Biometra) eingesetzt. Das Gerät besteht aus einer horizontalen Elektrophoresekammer, die im Boden eine UV-Röhre enthält, mit der die Wanderung der DNA im Gel verfolgt werden kann. Die Lampe sollte allerdings immer nur kurzzeitig angeschaltet werden, da UV-Licht die DNA schädigt. Die Kammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt, der die gleiche Ethidiumbromidkonzentration wie das Gel enthielt. Bei einer Spannung von 50 V wanderte die DNA im Gel, bis die zu isolierende Bande die Fangtasche im unteren Abschnitt des Gels fast erreicht hatte. Nun wurde soviel des Laufpuffers abgenommen, bis das Gel gerade nicht mehr bedeckt war, und dann die Fangtasche mit Fokussierlösung (1 x TAE, 10% Saccharose, 3 M Natriumacetat pH 6,0) gefüllt. Die Elektrophorese wurde fortgesetzt, bis die gesamte Bande in der Tasche fokussiert war. Der Inhalt der Tasche wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch eine Ethanolfällung gereinigt und konzentriert.

### 2.1.3.3 Elution mit DEAE-Zellulose

Als Alternative zur Elution der DNA mittels Glaspulver-Adsorption wurde die Elution mit DEAE-Zellulose verwendet. Ein Vorteil war hierbei, daß keine Glaspartikel in der eluierten DNA verbleiben, die z. B. eine DNA-Mengenbestimmung im Photometer stören.

Die DNA-Fragmente wurden zunächst in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zwei Stücke DEAE-Zellulose-Membran wurden auf Breite der DNA-Bande und Höhe des Gels zugeschnitten, 5 min in 10 mM EDTA pH 8,0 und 5 min in 0,5 N NaOH gewaschen und anschließend 6 x in sterilem H<sub>2</sub>O gespült. Unter UV-Licht wurde dann unterhalb und oberhalb der Bande ein Einschnitt gesetzt und je ein Stück der zuvor präparierten Membran eingeschoben. Der Gellauf wurde fortgesetzt, bis die DNA auf der Membran fixiert war (UV-Kontrolle). Die oberhalb der Bande eingesteckte Membran diente zum Abfangen kontaminierender Banden und wurde verworfen. Die unterhalb der Bande eingebrachte Membran mit der adsorbierten DNA wurde nun in Niedrigsalz-Waschpuffer (50 mM TrisHCl pH 8,0; 0,15 M NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0) transferiert und darin kurz gespült, um Agarosereste zu entfernen. Anschließend wurde die Membran in ein Eppendorfgefäß gebracht und mit Hochsalz-Elutionspuffer (50 mM TrisHCl pH 8,0; 1 M NaCl; 10 mM EDTA pH 8,0) bedeckt. Nach einer Inkubation bei 65°C für 30 min wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Membran noch einmal für 15 min nacheluiert. Die abgenommenen Überstände wurden vereinigt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt.

### 2.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Um DNA in wässriger Lösung von Verunreinigungen mit apolaren hydrophoben oder partiell hydrophoben Substanzen, z.B. von Proteinen, zu reinigen, wurde eine Extraktion mit den organischen Lösungsmitteln Phenol und Chloroform durchgeführt.

Unter dem Abzug wurde Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) im Verhältnis 1:1 zur DNA-Lösung gegeben und gründlich gemischt. Durch kurze Zentrifugation (12000 g, Raumtemperatur) wurden die Phasen getrennt. Denaturierte Proteine blieben in der organischen Phase zurück oder bildeten eine weißliche Interphase. Die obere wässrige Phase enthielt die DNA und wurde vorsichtig abpipettiert und gesammelt. Der Vorgang wurde je nach Grad der Verunreinigung wiederholt.

### 2.1.5 Ethanolfällung

Um die DNA von Salzen und Lösungsmittelrückständen vorausgegangener Behandlungen zu reinigen oder die DNA-Konzentration in einer Lösung zu erhöhen, wurde die wässrige Lösung, welche die DNA enthielt, mit 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat und mit zwei Volumina Ethanol versetzt. Die Präzipitation der DNA erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , was bei kleineren DNA-Fragmenten zu einer größeren Ausbeute führte. Nach 30-minütiger Zentrifugation (12000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Sediment mit 70%igem Ethanol (80%ig bei kleinen DNA-Fragmenten) gewaschen. Nachdem nochmals 5 min abzentrifugiert wurde, konnte der Überstand dekantiert werden. Das Sediment wurde 5 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

### 2.1.6 DNA-Mengenbestimmung durch Absorptionsmessung

Die Konzentration einer DNA-haltigen Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Für doppelsträngige DNA entspricht eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  einer optischen Dichte von 1 nach Durchtritt der Strahlung durch eine 1 cm dicke Quarzküvette. Für einzelsträngige DNA und RNA liegt die entsprechende Konzentration bei 40  $\mu\text{g/ml}$ , für Oligonukleotide bei 25  $\mu\text{g/ml}$ . Die Aufnahme eines Absorptionsspektrums zwischen 210 nm und 310 nm erlaubt Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA. Das Absorptionsmaximum sollte bei 260 nm liegen, der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm zwischen 1,8 und 2,0.

### 2.1.7 Restriktionsenzymspaltung

In einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  wurden bis zu 1  $\mu\text{g}$  DNA in dem entsprechenden Reaktionspuffer mit dem Restriktionsenzym für eine Stunde inkubiert. Für größere DNA-Mengen mußte das Reaktionsvolumen erhöht und die Inkubationszeit verlängert werden (über Nacht). Die benötigte Enzymmenge war abhängig von der DNA-Menge und der Anzahl der Schnittstellen. Sie ließ sich über die Definition der Enzymeinheit abschätzen: Eine Einheit (E) schneidet 1  $\mu\text{g}$   $\lambda$ -Phagen-DNA in einer Stunde. Die Reaktionstemperatur war abhängig von dem verwendeten Enzym.

## 2.1.8 Enzymatische Behandlung der zu ligierenden DNA

### 2.1.8.1 Proteinase-K-Behandlung

Die mit der PCR-Reaktion hergestellten Inserts wurden mit Hilfe immobilisierter Proteinase K von mit der DNA assoziierten Proteinen (wie z. B. der Polymerase) gereinigt, so daß die DNA-Enden den weiteren enzymatischen Reaktionen zugänglich waren. Dazu wurden 10 µl immobilisierte Proteinase K (1,3 mg/ml) in 200 µl 50 mM TrisHCl pH 7,5 aufgeschlämmt, kurz abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dazu wurden 50 µl DNA-Lösung gegeben, zwei Minuten gemischt, kurz abzentrifugiert und 40 µl des Überstandes abgenommen, der Rest verworfen. Eine Phenol-Chloroform-Extraktion zum Entfernen der Proteinase war nicht nötig, da sie an Partikel gebunden war, die sich vollständig durch Zentrifugation entfernen ließen.

### 2.1.8.2 Behandlung der PCR-Fragmente mit Klenow-Polymerase

DNA-Fragmente, die mit Hilfe der Taq-Polymerase synthetisiert werden, tragen häufig am 3'-Ende ein zusätzliches Adenosin-Molekül (3'-Überhang; Clark 1988), welches die Ligationsreaktion behindert. Dieses Adenosin-Molekül kann durch die 3'-Exonuklease-Aktivität der Klenow-Polymerase entfernt werden. Obwohl die 3'-Exonuklease-Aktivität des Klenow-Fragmentes gering ist, reicht sie in der Regel aus, um PCR-Fragmente zu behandeln. Eine größere 3'-Exonuklease-Aktivität besitzt die T4-DNA-Polymerase, die zur Entfernung von größeren 3'-Überhängen wie z.B. nach Restriktionsenzymsspaltung von DNA eingesetzt werden kann.

Die Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Bis zu 500 ng DNA wurden in einem Puffer bestehend aus 50 mM TrisHCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM DTT aufgenommen, mit 2,5 µM jeden dNTPs und 2 E Klenow-Fragment in einem Volumen von 20 µl für 15 min bei 30°C inkubiert und zur Inaktivierung des Enzyms anschließend für 10 min auf 75°C erhitzt.

### 2.1.8.3 Phosphorylieren der PCR-Fragmente

Da die zur PCR eingesetzten Oligonukleotide an ihrem 5'-Ende keine Phosphatgruppe tragen, muß das synthetisierte DNA-Fragment vor einer Ligationsreaktion phosphoryliert werden.

Dazu wurde 1 µg DNA in 1 x Polynukleotidkinasepuffer (Fermentas) mit 1 mM ATP, 6% PEG 6000 und 10 E Polynukleotidkinase für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch zehnmütiges Erhitzen auf 75°C abgestoppt.

Der Zusatz von PEG soll eine längere Aktivität des wenig stabilen Enzyms gewährleisten und dadurch die Effizienz der Phosphorylierungsreaktion erhöhen (Harrison & Zimmermann 1986).

### 2.1.8.4 Auffüllen der Vektorenden mit Klenow-Polymerase

Der Luciferase-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Sma*I geschnitten, die ein DNA-Ende mit Einzelstrangüberhang („sticky end“) und eines mit glatten Enden („blunt end“) ergeben. Deshalb mußte das überhängende Ende aufgefüllt werden, um das Insert in einer „blunt-end“-Ligation einfügen zu können.

Die geschnittene und durch Agarosegelelektrophorese gereinigte Vektor-DNA wurde in einem Puffer bestehend aus 50 mM TrisHCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 20 µM jeden dNTPs und 50 µg/ml BSA aufgenommen und mit 3 E Klenow-Polymerase pro µg DNA bei 30°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 75°C abgestoppt.

### 2.1.8.5 Dephosphorylieren der Vektorenden

Um einen Ringschluß des Vektors ohne Einfügen eines Inserts während der Ligationsreaktion zu verhindern, muß die Phosphatgruppe an den Enden des Moleküls durch Behandlung mit Krabbenphosphatase entfernt werden. Da eine Bindung zwischen zwei DNA-Fragmenten nur unter Abspaltung einer freien Phosphatgruppe ausgebildet werden kann, entstehen im Idealfall nur rekombinierte Plasmide mit mindestens einem Insert. Die nach der Ligation verbleibende Lücke in einem DNA-Strang des Plasmids (Nick) wird nach der Transformation in der Bakterienzelle geschlossen.

In einem Volumen von 20 µl wurde 1 µg linearisierte und mit Klenow-Polymerase behandelte Vektor-DNA mit 1 E Krabbenphosphatase in dem entsprechenden Reaktionspuffer (20 mM TrisHCl pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

### 2.1.9 Ligation von Insert und Vektor

Die PCR-Fragmente bzw. das aus dem β-Galactosidase-Vektor herausgeschnittene und mit Klenow-Polymerase aufgefüllte Fragment, welches den frühen SV40-Promotor und Enhancer enthält, wurden in einer „blunt-end“-Ligationsreaktion durch die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4-DNA-Ligase) in den Luciferase-Vektor ligiert.

Im Gegensatz zur Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden („sticky ends“) ist die „blunt end“-Ligation weniger effizient, und es existieren verschiedene Protokolle, welche die Effizienz der Reaktion erhöhen und das Verhältnis intermolekularer zu intramolekularen Ligationen spezifisch beeinflussen sollen. Folgende Zusätze zum Ligationsansatz wurden zur Optimierung dieser Ligationsreaktion getestet:

- 10% PEG 6000, 100 mM NaCl, Inkubation über Nacht bei 37°C (Hayashi *et al.* 1985)
- 10% PEG 6000, 100 mM NaCl, Inkubation für 1 h bei 37°C (Stimulation intermolekularer Ligationen), dann über Nacht bei 16°C (Ermöglichen intramolekularer Ligationen; Hayashi *et al.* 1985)
- 15% PEG 6000, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (Pheiffer & Zimmermann 1983)
- 15% PEG 6000 (Stimulation intermolekularer Ligationen), Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur, verdünnen auf 7% PEG (Stimulation intramolekularer Ligationen) mit Ligasepuffer, weiter Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht (Pheiffer & Zimmermann 1983)
- 1 mM Hexamincobaltchlorid (Steigerung intermolekularer Ligationen um den Faktor 50), Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (Rusche & Howard-Flanders 1985)
- 1 mM Hexamincobaltchlorid, Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur, Zugabe von 30 mM KCl (Stimulation intramolekularer Ligationen) und weitere Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht (Rusche & Howard-Flanders 1985)

Pro 10 µl-Ligationsansatz wurden 100-300 ng Vektor-DNA mit Insert-DNA (molares Verhältnis Vektor : Insert von 1 : 2) in Ligasepuffer mit 0,5 mM ATP, 10 mM DTT und 1 E T4-DNA-Ligase inkubiert. Als vergleichsweise zuverlässig erwies sich das Protokoll mit Zusatz von 1 mM Hexamincobaltchlorid und 30 mM KCl mit Inkubation bei Raumtemperatur (s.o.), welches deshalb standardmäßig verwendet wurde. Die Ligationsreaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA abgestoppt.

### 2.1.10 Sequenzierung des Konstruktes

Zur Sequenzierung der zuvor in Bakterien amplifizierten und durch eine Plasmidpräparation gewonnenen DNA der rekombinierten Plasmide (s.u.) wurde das *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin-Elmer) verwendet. Dieser als „Taq-Cycle-Sequenzierung“ bezeichnete Methode (Manoni *et al.* 1992) liegt eine Modifikation der Methode nach Sanger zugrunde (Sanger *et al.* 1977).

Mit Hilfe einer DNA-Polymerase und eines Oligonukleotid-Primers wurden unter Zugabe von dNTPs und Didesoxynukleotiden, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren („Dye-Terminatoren“), Kopien des zu sequenzierenden Stranges synthetisiert. Der Einbau eines ddNTPs führte zum Kettenabbruch, weil die für die Phosphordiesterbindung benötigte 3'-OH-Gruppe fehlte. So entstanden in der Größe abgestufte Fragmente mit einem durch den Primer festgelegten 5'-Ende und variablem 3'-Ende, das ein spezifisches fluoreszenzmarkiertes ddNMP trug. Diese Fragmente konnten nun der Größe nach in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt werden. Der verwendete ABI 373A DNA-Sequencer (Applied Biosystems) enthielt einen Argonlaser, der während der Elektrophorese das Gel abtastete und die Fluoreszenzfarbstoffe anregte. Die dadurch entstehenden Lichtsignale wurden von einem Photomultiplier detektiert und in digitale Signale umgewandelt. Auf einem angeschlossenen Macintosh-Computer wurde aus diesen Daten das Gelbild erstellt, das mit entsprechender Software ausgewertet werden konnte.

#### 2.1.10.1 Sequenzierreaktion

500 ng Matritzen-DNA, 8 µl Terminator ready reaction mix und 10 pmol Primer wurden gemischt, mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl gebracht und mit Paraffin überschichtet. Als modifizierte PCR fand die Sequenzierreaktion in einem Thermocycler mit folgendem Tempera-

turprofil statt: 25 Zyklen mit je 15 s 96°C, 15 s 50°C, 4 min 60°C. Die verwendete AmpliTaq-DNA-Polymerase hat ein Temperaturoptimum für die Polymerasereaktion von 60°C. Diese Mutante der Taq-DNA-Polymerase zeichnet sich durch eine höhere Einbaurate fluoreszenzmarkierter ddNTPs aus.

Das Reaktionsprodukt wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, in einer Ethanolfällung präzipitiert und in 5 µl Ladepuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 2 min bei 100°C denaturiert.

### 2.1.10.2 Sequenziergel und Elektrophorese

Für die Gellösung wurden 30 g Harnstoff in 9,5 ml 40%igem Acryl/Bisacrylamid (20:1), 6 ml 10 x TBE und 22,5 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert, unter Vakuum entgast und zur Polymerisation mit 180 µl 10%iger Ammoniumpersulfatlösung und 24 µl TEMED versetzt. Die Gellösung wurde sofort zwischen zwei zuvor mit deionisiertem Wasser und Isopropanol/Wasser (9:1) gereinigte Glasplatten gegeben, die durch seitliche Spacer auf 0,4 mm Abstand gehalten wurden.

Nach einer Polymerisationszeit von ca. 2 h konnte das Gel in den Sequencer eingespannt, mit 1%iger Agarose abgedichtet und die Elektrophoresekammern mit TBE-Laufpuffer gefüllt werden. Die durch das Einsetzen eines Kammes am oberen Gelende gebildeten Taschen wurden ausgespült und nach einem 30-60 minütigem Vorlauf des Gels mit den Proben beladen. Der Gellauf erfolgte für 12 h über Nacht bei maximal 2500 V, 30 W und 40 mA.

### 2.1.11 Southern-Blot

Das von Southern (1975) entwickelte Verfahren des Southern Blots bildet die Grundlage für den spezifischen Nachweis von DNA-Fragmenten: In einem Agarosegel werden DNA-Fragmente nach ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und anschließend auf eine Membran übertragen. Die Position der DNA-Fragmente bleibt während des Transfers auf die Membran erhalten und kann durch eine Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (oder einem nichtradioaktiven Alternativverfahren) spezifisch nachgewiesen werden.

Zunächst wurden 5-15 µg genomische Maus-DNA (Balb/c) mit einem Restriktionsenzym in einer Über-Nacht-Reaktion gespalten und anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion



und Ethanolgefällung gereinigt. In einem 1,5%igem Agarosegel wurden die DNA-Fragmente und ein DNA-Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem der Gellauf abgeschlossen war, wurde das Gel mit einem anliegenden Maßstab auf dem UV-Tisch fotografiert, um Hybridisierungsbanden später zuordnen zu können.

Das Gel wurde zum Denaturieren der DNA für 20-30 min in Alkalitransferpuffer (1,5 M NaCl; 0,25 M NaOH) geschwenkt. Ein vorheriges partielles Depurinieren der DNA mit 1,8%iger HCl war nur nötig, wenn Fragmente größer als 5 kb geblottet werden sollten. Auf einer Glasplatte wurde nun ein in Alkalitransferpuffer getränktes Whatman-Filterpapier gelegt, welches mit seinen Enden in einen Vorratsbehälter mit Alkalitransferpuffer reichte. Darauf wurden einige weitere getränkte Filterpapiere geschichtet, deren Größe der des zu blottenden Gels entsprach. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf die Filterpapiere platziert. Um das Gel herum wurden die überstehenden Ränder der Filterpapiere mit Parafilm abgedeckt. Auf das Gel wurde die zuvor mit sterilem Wasser angefeuchtete Nylonmembran unter Vermeidung von Luftblasenbildung gelegt. Es folgten drei weitere in Alkalitransferpuffer getränkte sowie fünf trockene Filterpapiere. Als Abschluß wurde ein Stapel saugfähiger Tücher und ein Gewicht zum Beschweren obenaufgelegt. Durch Kapillarkräfte wurde der Alkalitransferpuffer im Verlauf mehrerer Stunden durch Gel und Membran nach oben gesaugt, was zu einem Transfer der DNA aus dem Gel auf die darüberliegende Membran führte. Nach dem Abbau des Blots wurden die Geltaschen auf der Membran markiert, um eine spätere Zuordnung der einzelnen Spuren zu ermöglichen. Vor der Hybridisierung wurde die DNA auf der Membran durch UV-Crosslinking fixiert.

### 2.1.12 Colony-Blot

Auf ampicillinhaltigen großen Agarplatten ( $\varnothing$  13 cm) wurde die Cosmid-Bibliothek (Stratagene) in einer Dichte von 2500 Kolonien pro Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für den Blot wurden Nylonmembranen auf Plattengröße zugeschnitten und autoklaviert. Dann wurden die Membranen auf die vorgekühlten Platten gelegt und vorsichtig angedrückt. Mit einer sterilen Kanüle wurde eine Markierung angebracht, die auch auf den Boden der Platte übertragen wurde. Die Membranen wurden von den Platten abgenommen und auf einem Plastiktablett je 15 min mit Denaturierungslösung (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl) und anschließend mit Neutralisierungslösung (0,5 M TrisHCl pH 7,5; 1,5 M NaCl) inkubiert. Nach 10-minütigem Waschen mit 2 x SSC wurden die Membranen auf Whatman-Filterpapier

getrocknet und mit UV-Licht gecrosslinkt. 1 ml einer Proteinase-K-Lösung (2 mg/ml Proteinase K in 2 x SSC) wurde nun auf jeden Blot gegeben und 1 h bei 37°C unter Plastikfolie inkubiert. Dann wurde die Membran zwischen zwei angefeuchtete Whatman-Papiere geblottet. Die Bakterienreste wurden so von der Membran entfernt. In Plastikfolie eingeschweißt wurden die Membranen bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert.

## 2.1.13 Radioaktives Hybridisierungsverfahren

### 2.1.13.1 Radioaktive Markierung der Sonden-DNA

Die Markierungsreaktion erfolgte durch „random priming“ unter Verwendung des *Oligolabeling-Kits* (Pharmacia) nach Anleitung des Herstellers. 50 ng Sonden-DNA wurden bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Auf einen Reaktionsansatz von 50 µl wurden 10 µl *Reagent-Mix*, 1 E Klenow-Polymerase und 50 µCi  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zu der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O gegeben. Die Reaktion fand für eine Stunde bei 37°C statt. In einer anschließenden Ethanolfällung wurden die nicht eingebauten Nukleotide abgetrennt. Das Sediment enthielt die markierte Sonde und wurde in 200 µl TE resuspendiert.

Zur Bestimmung der Einbaurate wurde eine Trichloressigsäure-Fällung durchgeführt. Die Glasfaserfilter wurden in Szintillationsflüssigkeit im Flüssigszintillationszähler gemessen und der Meßwert auf Ipm/µg DNA umgerechnet.

### 2.1.13.2 Hybridisierungsreaktion

Die geblottete Membran wurde mit 2 x SSC angefeuchtet und in einer Hybridisierungsröhre mit 5 ml Hybridisierungspuffer und 500 µg denaturierter Lachssperma-DNA für einige Stunden bei 42°C vorhybridisiert. Danach wurde die frisch denaturierte radioaktiv markierte Sonden-DNA dazugegeben und die Hybridisierungsreaktion über Nacht (>12 h) bei 42°C durchgeführt. Je nach gewünschter Stringenz wurde die hybridisierte Membran mit einer Waschlösung bestehend aus 0,1% SDS und 0,1-2 x SSC bei einer Temperatur von 20-55°C gewaschen. Mit dem Handmonitor wurde die während des Waschvorgangs auf der Membran verbleibende Aktivität kontrolliert.

Anschließend wurde der Blot in Plastikfolie eingeschweißt und zur Detektion der Hybridisierungssignale auf einem Röntgenfilm oder auf einem frisch gelöschten Screen eines Phosphor-Imagers exponiert.

## **2.1.14 Nicht-radioaktives Hybridisierungsverfahren (Digoxigenin-System)**

### **2.1.14.1 Digoxigeninmarkierung der Sonden-DNA**

Um eine Digoxigenin-markierte Sonde mittels „random priming“ herzustellen, wurde 1 µg DNA in 16 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, 10 min aufgekocht und sofort auf Eis/Ethanol abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl DIG-High Prime (5 x) wurde der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zusatz von 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 und Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Die Quantifizierung des Markierungsergebnisses erfolgte colorimetrisch im Vergleich mit einem Teststreifen, auf den bekannte Mengen markierter DNA aufgetragen waren.

### **2.1.14.2 Hybridisierungsreaktion**

Die Membranen wurden bei 68°C eine Stunde mit 60 ml Standard-Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Anschließend wurde über Nacht mit 6 ml Standard-Hybridisierungspuffer und 10-20 ng/ml markierter Sonden-DNA, die zuvor durch Kochen denaturiert wurde, bei 68°C hybridisiert. Der Blot wurde zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC; 0,1% SDS und zweimal für 15 min bei 68°C in 0,5 x SSC; 0,1% SDS gewaschen. Bei Raumtemperatur wurde der Blot dann 5 min in 100 ml Waschpuffer (Maleinsäurepuffer; 0,3% Tween 20) gewaschen, anschließend 30 min in 1 x blocking buffer und 30 min in Antikörperlösung (20 ml 1 x blocking buffer mit 2 µl anti-DIG-AP-Konjugat) inkubiert. Der Blot wurde zweimal für 15 min in 100 ml Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen und dann für 2 min in 20 ml Detektionspuffer inkubiert. Nach dem Auftropfen von 25 Tropfen CSPD-Substrat wurde der Blot eingeschweißt und 15 min bei 37°C inkubiert. Der Nachweis der Chemilumineszenz-Signale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms für 10-90 min.

Ein Alternativprotokoll (Engler-Blum *et al.* 1993), das die Sensitivität des Digoxigenin-Systems verbessern soll, wurde ebenfalls getestet.

## 2.2 Arbeiten mit Bakterien

### 2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien mit Calciumchlorid

Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes MC 1061 wurde von einer Bakterienplatte in ein Reagenzröhrchen mit 5 ml LB-Medium überimpft. Das Röhrchen wurde über Nacht in einem Bakterenschüttler bei 37°C geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurden 0,1 ml auf 20 ml LB-Medium angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis eine Konzentration von ca.  $5 \times 10^8$  Bakterien/ml erreicht war, was im Lange-Photometer einer Trübung von 0,6 bei einer Wellenlänge von 560 nm entsprach. Dann wurde das Gefäß mit der Bakteriensuspension für 10 Minuten im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien mit 4000 g bei 0°C für 10 Minuten abzentrifugiert, das Sediment in 10 ml (0,5 Vol.) eiskaltem 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  pH 5,0 resuspendiert und für 20 Minuten im Eisbad inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde erneut bei 4000 g und 0°C für 10 Minuten zentrifugiert und das Sediment dann in 2 ml (0,1 Vol.) kaltem 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  pH 5,0 resuspendiert. Die Bakterien wurden nun für mindestens eine Stunde im Eisbad inkubiert, bevor sie zur Transformation eingesetzt wurden. Längere Inkubation bei 4°C erhöht innerhalb der ersten 24 Stunden die Kompetenz, die dann langsam wieder abnimmt (Dagert & Ehrlich 1979).

### 2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien mit FSB-Puffer

Aus einer Einzelkolonie *Mos blue competent cells* wurde eine 100 ml-Kultur, wie oben für die Calciumchlorid-Methode beschrieben, angezüchtet. Die Bakterien wurden 10 min bei 0°C und 4000 g abzentrifugiert und das Sediment in 20 ml FSB-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Sediment in 4 ml FSB-Puffer resuspendiert und nach Zusatz von 140 µl DMSO für 15 min auf Eis gestellt. Nachdem weitere 140 µl DMSO zugegeben wurden, konnten je 200 µl der kompetenten Bakterien in ein Einfriergefäß gefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Transformation gelagert werden.

### 2.2.3 Transformation von Bakterien

Pro Ansatz wurden 200 µl mit  $\text{CaCl}_2$  kompetent gemachte MC 1061-Bakterien auf Eis mit 10 µl DNA in TE oder Wasser bzw. aus einer Ligationsreaktion gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte ein sogenannter Hitzeschock für 5 Minuten in einem Wasserbad mit 37°C. Anschließend wurden 2 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium dazugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C im Bakterienschüttler geschüttelt. Nun wurden 100 µl der Bakteriensuspension direkt auf eine Agarplatte mit dem Antibiotikum ausplattiert, gegen das ein Gen auf dem transfizierten Plasmid Resistenz vermittelt (Selektionsagar), sowie weitere 100 µl in einer 1:10-Verdünnung. Zusätzlich wurden die übrigen Bakterien kurz bei 4000 g abzentrifugiert, das Sediment in 200 µl Medium resuspendiert und ebenfalls auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Bakterienplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das Protokoll für die mit FSB kompetent gemachten *Mos blue competent cells* unterschied sich nur in Temperatur und Dauer des Hitzeschocks von dem oben beschriebenen Vorgehen: Die Bakterien mit der aufzunehmenden DNA wurden für 40 s bei 42°C und danach für 2 min auf Eis inkubiert.

Als Kontrolle der Lebensfähigkeit der Bakterien wurden 100 µl der Bakteriensuspension in einer 1:10<sup>6</sup>-Verdünnung auf eine Platte ohne Antibiotikazusatz ausplattiert.

Die Kompetenz der Bakterien wurde getestet, indem 10 ng DNA eines Kontrollvektors mit einem Antibiotika-Resistenz-Gen zur Transformation eingesetzt wurden. Die auf einer das Antibiotikum enthaltenden Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonien wurden gezählt und auf cfu (colony forming units = „Koloniebildende Einheiten“) pro µg DNA als Maß der Kompetenz umgerechnet.

### 2.2.4 Identifizierung positiver Klone durch PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion konnten DNA-Sequenzen, die auf einem zuvor in das Bakterium eingebrachten Plasmid lagen, spezifisch mit geeigneten Primern amplifiziert werden. Um zu testen, ob ein durch Ligation aus Vektor und Insert entstandenes Plasmid das Insert in der gewünschten Orientierung enthält, wurde je ein Primer aus der Insert- und ein Primer aus der Vektorsequenz gewählt. Es entsteht nur dann ein Produkt, wenn die Primer der

beiden komplementären DNA-Stränge mit ihren 3'-Enden aufeinander zuweisen, deshalb kann unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen mit Hilfe der PCR das Vorliegen eines Plasmids in Bakterien und die Orientierung eines Inserts in diesem Plasmid nachgewiesen werden.

Dazu wurde von einer Bakterienplatte die zu untersuchende Kolonie auf ein Röhrchen mit 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und für einige Stunden bei 37°C im Bakterienschüttler geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurden, je nach Dichte der Bakteriensuspension, 2-5 µl in ein PCR-Gefäß gegeben und Primer, dNTPs, PCR-Puffer und Polymerase nach den oben beschriebenen Standardbedingungen dazugegeben. Der Ansatz wurde für 2 min auf 94°C erhitzt, damit die Bakterien lysiert wurden und die DNA der folgenden Reaktion zugänglich war. Dann wurden 25-30 PCR-Zyklen nach folgendem Temperaturschema im Thermocycler durchgeführt: 94°C für 1 min, 52°C für 1 min, 72°C für 3 min. Anschließend wurde ein Aliquot des Produktes durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Wenn das Plasmid in den Bakterien vorlag, fand sich nun ein DNA-Amplifikat der entsprechenden Länge bei Betrachtung des ethidiumbromidhaltigen Gels unter UV-Licht.

### 2.2.5 Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurden Kits der Firma Qiagen verwendet.

Eine Mini-Präparation aus 1-3 ml Bakterienkultur ermöglichte die Aufreinigung von bis zu 20 µg DNA. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4000 g zentrifugiert und dann der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde in 300 µl Puffer P1 (50 mM TrisHCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer P2 (200 mM NaOH; 1% SDS) wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In Gegenwart des Detergenzes SDS kommt es zur Auflösung der Zellmembran, RNase A degradiert bakterielle RNA, NaOH denaturiert Proteinbestandteile der Bakterienzelle. Danach wurden 300 µl Puffer P3 (3 M KAc pH 5,5) hinzugegeben und sofort vorsichtig gemischt. Es entstand ein Präzipitat aus Zelltrümmern mit daran gebundener genomischer DNA, denaturierten Proteinen, Detergenz und Salz. Anschließend wurde das Präzipitat durch Zentrifugation mit 15000 g für 15 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf eine zuvor mit 1 ml QBT-Puffer äquilibrierte *Qiagen-tip* 20-Säule gegeben.

Diese Säulen sind mit einer Matrix gefüllt, die unter bestimmten Salz- und pH-Bedingungen eine Adsorption der Plasmid-DNA bewirkt (Anionenaustauschersäulen). Die Säule mit der adsorbierten Plasmid-DNA wurde nun zweimal mit je 1 ml QC-Puffer gewaschen. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 800 µl QF-Puffer auf die Säule gegeben und das Eluat in einem frischen Eppendorfgefäß aufgefangen. Durch eine Alkoholfällung wurde die Plasmid-DNA präzipitiert und in einem kleinen Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Für eine Maxipräparation wurden aus 150-500 ml Bakterienkultur bis zu 500 µg Plasmid-DNA gewonnen. Das Volumen der Puffer P1-P3 wurde auf 10 ml erhöht und der Überstand auf eine *Quiagen-tip 500*-Säule gegeben. Zum Waschen wurden 30 ml QC-Puffer, und zur Elution 15 ml QF-Puffer verwendet. Wie bei der Mini-Präparation schloß sich eine Ethanol- oder Isopropanolfällung an.

Zur Präparation von Plasmid-DNA, die zur Transfektion eukaryotischer Zellen bestimmt war, wurde das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen verwendet. Das Protokoll gleicht bis auf einen Zwischenschritt zur Abtrennung von bakteriellen Endotoxinen dem der Maxipräparation. Zu beachten ist, daß die verwendeten Lösungen und Gefäße frei von Endotoxinen sind.

### 2.2.6 Identifikation positiver Klone durch Restriktionsenzymspaltung

Um zu testen, ob ein Plasmidvektor ein bestimmtes Insert enthielt, wurde das Plasmid mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten. Dabei wurde ein Enzym gewählt, das im Insert eine oder mehrere Schnittstellen fand, so daß nur dann ein linearisiertes Plasmid oder Fragmente bestimmter Länge entstanden, wenn das Insert im Vektor enthalten war.

Wenn gleichzeitig die Orientierung des Inserts überprüft werden sollte, wurde ein zweites Enzym ausgewählt, das in der Vektorsequenz eine Schnittstelle besaß und im Doppelverdau mit dem im Insert schneidenden Enzym je nach Orientierung des Inserts unterschiedlich große Fragmente lieferte.

Die Beurteilung der Fragmentlängen erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung des geschnittenen Plasmids im ethidiumbromidhaltigen Agarosegel unter UV-Beleuchtung im Vergleich mit einem DNA-Längenstandard.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Kultur von Rat-1-Zellen

Die Zellen der adhärenenten Fibroblastenzelllinie Rat-1 wurden in *Dulbeccos Modified Eagles Medium* (DMEM) mit 5% FKS bei 10% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Zweimal wöchentlich wurde eine Subkultur in einer Verdünnung von 1 : 40 und 1 : 80 angelegt.

### 2.3.2 Kultur von HCD-57-Zellen

Bei der HCD-57-Zelllinie handelt es sich um erythropoietinabhängige erythroide Vorläuferzellen der Maus, die in Suspensionskultur wachsen. Die Zellen wurden in *Iscove's-Medium* mit Erythropoietinzusatz und 30% FKS bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Zweimal pro Woche wurde eine Subkultur angelegt.

### 2.3.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen

#### 2.3.3.1 Transfektion von Rat-1-Zellen

Zur Transfektion von Rat-1-Zellen mit Plasmid-DNA wurde *SuperFect Transfection Reagent* der Firma Qiagen verwendet. Das Reagenz besteht aus Polykationen, die mit den negativ geladenen DNA-Molekülen einen an der Oberfläche positiv geladene Komplex bilden. Dieser Komplex kann an negativ geladene Oberflächenrezeptoren der Zelle binden und wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Zur Transfektion wurden Rat-1-Zellen aus einer noch nicht konfluent gewachsenen Kultur in einer Konzentration von  $8 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in eine 6-Loch-Gewebekulturplatte eingesät. Am nächsten Tag konnten diese Zellen zur Transfektion verwendet werden. In einem Polystyrolröhrchen wurden pro Transfektionsansatz 1-2 µg DNA auf 100 µl serumfreies DMEM gegeben und gemischt. Nach Zugabe von 10 µl *SuperFect*-Reagenz wurde der Ansatz noch einmal gründlich gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich der DNA-Kation-Komplex bilden konnte. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit PBS-



Puffer gewaschen; anschließend wurde der Transfektionsansatz nach Zugabe von 600 µl komplettem Medium gleichmäßig auf die Zellen getropft. Nach zwei bis drei Stunden wurden die Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen und mit 2 ml frischem DMEM mit 10% Serum und Antibiotikazusatz versorgt. Die Zellen wurden bis zur Lyse zwei Tage lang in einem Brutschrank bei 37° C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.3.3.2 Transfektion von HCD-57-Zellen

Das Protokoll zur Transfektion von HCD-57-Zellen weicht in einigen Punkten von dem für Rat-1-Zellen ab:

Als Transfektionsagens wurde *Lipofectamine Reagent* (Gibco BRL) verwendet, das auf Liposomenbasis eine ähnliche Komplexbildung und Endozytose der Plasmid-DNA bewirkt, wie das zur Transfektion von Rat-1-Zellen verwendete *SuperFect*.

Zur Transfektion wurden in einem Eppendorfgefäß 3 µg Plasmid-DNA in 100 µl serumfreiem *Iscove's*-Medium mit Erythropoietinzusatz aufgenommen. In einem Polystyrolröhrchen wurden 10 µl *Lipofectamine Reagent* mit 90 µl Medium (mit Epo) gemischt. Anschließend wurde die DNA-Lösung zu der Lösung im Polystyrolröhrchen getropft, gemischt, und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden in der log-Phase befindliche Zellen (weniger als  $5 \times 10^5$  Zellen/ml) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  pro Ansatz bei 1000 g abzentrifugiert, in 0,8 ml pro Ansatz serumfreiem *Iscove's*-Medium mit Epo aufgenommen und in eine 6-Loch-Gewebekulturplatte ausgesät. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Transfektionsmischung zu den Zellen getropft. Nach drei Stunden wurde noch 1 ml komplettes Medium (mit 30% FKS und Epo) dazugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellen bei 1000 g abzentrifugiert und in 2 ml frischem Medium (mit 30% FKS und Epo) aufgenommen. Die Zellen wurden bis zur Lyse weiterhin im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.3.4 Lyse der transfizierten Zellen

#### 2.3.4.1 Lyse von Rat-1-Zellen

Die adhärennten Rat-1-Zellen wurden in der 6-Loch-Gewebekulturplatte lysiert. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt; anschließend wurden die Zellen auf der Platte mit je 2 ml PBS-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde danach vollständig abgesaugt. Zum Lysieren der Zellen wurden 250 µl *Cell Culture Lysis Reagent* (Promega) pro Ansatz verwendet. Nach 10 Minuten Einwirkzeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber gründlich von der Unterlage abgelöst. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 12000 g bei 4°C in der Kühltzentrifuge für 1 Minute zentrifugiert, um Zellreste abzutrennen. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und bis zur Messung der Luciferase-Aktivität auf Eis aufbewahrt. Dabei mußte berücksichtigt werden, daß das Lysat zum Zeitpunkt der Messung Raumtemperatur haben sollte, um temperaturbedingte Schwankungen der Enzymaktivität zu vermeiden.

#### 2.3.4.2 Lyse von HCD-57-Zellen

Die nichtadhärennten HCD-57-Zellen mußten zunächst durch mehrmaliges Pipettieren in Suspension gebracht, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 g für 10 min abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde abgesaugt, ohne das in der Spitze befindliche lockere Zellsediment aufzuwirbeln. Dann wurden die Zellen ebenfalls in PBS-Puffer gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Das nun zurückbleibende Sediment wurde in 250 µl *Cell Culture Lysis Reagent* resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 10 Minuten wurde das Lysat abzentrifugiert (12000 g, 4°C) und der Überstand zur Messung der Luciferase-Aktivität eingesetzt.

## 2.4 Reporter-gen-Assays

### 2.4.1 Luciferase-Assay

Bei der Durchführung des Luciferase-Assays wurde folgendes Protokoll befolgt:

20 µl Zellextrakt wurden in eine Küvette gegeben und in der Meßkammer des Luminometers (Berthold) platziert. Durch automatische Injektion des Luciferin-Reagenzes (150 µl) wurde die Reaktion gestartet und für 10 Sekunden die Lichtproduktion gemessen. Die Meßergebnisse wurden als „relative light units“ (RLU) ausgegeben. Es wurden jeweils drei Einzelmessungen durchgeführt und die Werte gemittelt.

Abweichend von diesem Standardprotokoll wurden 80-100 µl des Zellextraktes aus HCD-57-Zellen eingesetzt und in zwei Einzelmessungen die Lichtproduktion über einen Zeitraum von je 30 Sekunden gemessen.

#### 2.4.2 $\beta$ -Galaktosidase-Assay

Das für den  $\beta$ -Galactosidase-Assay gewählte Protokoll (Promega Technical Bulletin TB097) beruht auf der Messung der enzymatischen Hydrolyse von Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG). Das dabei entstehende Ortho-Nitrophenol kann im Photometer durch Bestimmung der Absorption bei 420 nm gemessen werden:

100 µl Zellysatz wurden in einem Eppendorfgesäß mit 50 µl Lysepuffer und 150 µl 2 x  $\beta$ -Galaktosidase-Assay-Puffer gemischt und anschließend für 30 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M TrisHCl pH 7,5 abgestoppt und die Absorption bei 420 nm in einem Photometer gemessen.

Da einige Zelllinien eine hohe Expression des eukaryotischen  $\beta$ -Galaktosidasegens aufweisen, ist es wichtig, die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität untransfizierter Zellen zu bestimmen und die gemessenen Werte der mit den Reporter-gen-Konstrukten transfizierten Zellen um diesen Wert zu korrigieren.

Das Zellysatzvolumen kann bei Bedarf bis auf 150 µl erhöht und die Inkubationszeit auf mehrere Stunden ausgedehnt werden.

Da unter der Bedingung der Substratsättigung die gemessene Absorption proportional der Menge des entstandenen Substrates ist, die wiederum abhängig ist von der Enzymmenge und der Inkubationszeit, kann die gemessene Absorption nach folgender Formel auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität umgerechnet werden, um die Werte vergleichbar zu machen (Herbomel *et al.* 1984):

$$\beta\text{-Galaktosidase-Aktivität} = \text{OD}_{420} \times 100 \text{ auf eine Stunde und } 150 \mu\text{l Zellysatz bezogen}$$

---

## 2.5 Proteinbestimmung in Zellysaten

Die Bestimmung des Proteingehaltes in einem Zellysatz kann zur Normierung von Ergebnissen enzymatischer Tests herangezogen werden. Hier wurde die Methode nach Lowry (1951) zur Proteinbestimmung verwendet.

20 µl Zellysatz wurden mit 0,1 M NaOH auf 100 µl aufgefüllt. Als Leerwert wurden 20 µl Lysepuffer eingesetzt. Pro Ansatz wurden 5 ml einer Lösung mit 0,02% NaK-Tartrat, 0,01%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 M NaOH hinzugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,5 ml einer 1:3-Verdünnung Folin-Ciocalteu-Reagenz zugesetzt, sofort gemischt und nach 45 min im Photometer die Absorption bei 750 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve mit BSA konnte der Proteingehalt der Proben bestimmt werden.

### 3 Material

#### 3.1 Puffer, Lösungen und Medien

**Alkali-Transferpuffer:** 1,5 M NaCl; 0,25 M NaOH

**β-Galactosidase-Assay-Puffer (2x):** 200 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,3; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM Mercaptoethanol; 1,33 mg/ml ONPG

**Denaturierungspuffer:** 0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl

**Denhardt'sche Lösung (100 x):** 2% Polyvinylpyrrolidon; 2% Ficoll; 2% BSA

**DMEM** (c.c.pro)

**Hybridisierungspuffer:** 5 x SSC; 5 x Denhardt'sche Lösung; 0,5% SDS; 50% Formamid; 5% Dextransulfat; 100 µg/ml Heringssperma-DNA

**Iscove's** (GIBCO BRL)

**LB-Medium :** 10 g bacto-Trypton, 5 g bacto-Hefeextrakt, 5 g NaCl, 1 g Glucose auf 1 l

**Luciferin-Substrat:** 470 µM Luciferin-Na-Salz; 270 µM Li-CoA; 530 µM ATP; 20 µM Tricin; 1,07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Mg(OH)<sub>2</sub>; 2,67 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT in 25 mM Glycylglycin

**Maleinsäurepuffer (10x):** 1 M Maleinsäure; 1,5 M NaCl; pH 7,5 mit NaOH einstellen

**Neutralisierungslösung:** 0,5 M TrisHCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl

**PBS:** 10 g/l NaCl; 0,25 g/l KCl; 1,41 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4

**PCR-Puffer (10x):** 400 mM NaCl; 500 mM TrisHCl, pH 8,0; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Gelatine

**Phosphatpuffer:** 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2; 1 mM EDTA; 10% SDS; 0,5% blocking reagent (Boehringer Mannheim)

**Sequenziergel-Lösung:** 30 g Harnstoff in 10 ml 40%igem Acrylamid (Endkonzentration 6,6%), 6 ml 10 x TBE, 22,5 ml H<sub>2</sub>O, 180 µl 10% APS und 24 µl TEMED

**Standard-Hybridisierungspuffer:** 5 x SSC; 0,1% Lauroylsarcosin; 0,02% SDS; 1% blocking reagent (Boehringer Mannheim)

**TAE:** 40 mM TrisHCl; 20 mM Na-Acetate; 1mM EDTA; pH 7,8 mit CH<sub>3</sub>COOH eingestellt

**TBE:** 100 mM TrisHCl; 100 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8,3 mit NaOH eingestellt

**TE:** 10 mM TrisHCl pH 8,0; 1 mM EDTA

**TNE:** 10 mM TrisHCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl

**Trypsinlösung:** 0,5% Trypsin, 0,2% EDTA in 10 x PBS

### 3.2 Oligonukleotide

**5'-Prom-1:** CCT GTG ACT TTT GCC TTC TAT GTG CAC AGG C

**5'-Prom-2:** GAG TTC TAG GGG TCA AGG GTC ACC AG

**3'-Prom-3:** CTC CAA CAT GGC CGC CTG CTG C

**pL-1:** CTA GCA AAA TAG GCT GTC C

**pL-2:** CCA ACT TCT GCA GTT AAG CG

**pSV-1:** TAC TTC TGG AAT AGC TCA GAG G

**5'-So4:** GAC ACC TGT ATC CAT CCA GG

**3'-So4:** GCT TTT CAC AGG GTA TAT AAA TG

**5'-So8:** GAT CTG TGG TTA CAT GCA TGC

### 3.3 Enzyme

**Taq-DNA-Polymerase** (Pharmacia)

**Klenow-Polymerase** (Pharmacia)

**Shrimps alkaline phosphatase** (USB)

**Restriktionsendonucleasen:** *Bgl*II (Fermentas), *Sma*I (Biolabs), *Nco*I (Biolabs), *Bst*EII (Biolabs)

**T4-DNA-Ligase** (Biolabs)

**T4-Polynucleotidkinase** (Fermentas)

---

**Immobilisierte Proteinase K** (Merck)

### 3.4 Plasmidvektoren und Cosmid-Genbank

**pluci3 basic:** pCAT3 basic (Promega), in dem das *CAT*-Gen durch das *luc*-Gen ersetzt wurde (Arbeitsgruppe Dr. S. Schäfer, Med. Virologie Uni Gießen)

**pZeoSVLacZ** (Invitrogen)

**Mouse Cosmid Genomic Library:** NIH/3T3-Zelllinie, Vektor pWE15 (Stratagene, 951301)

### 3.5 Zelllinien

**Rat-1:** Fibroblastenzelllinie (von T. Tamura-Niemann, Gießen)

**HCD-57:** erythroide Vorläuferzellen/Maus (von S. Ruscetti, USA)

### 3.6 Kits

**„DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“** zur Markierung von DNA-Sonden durch „random priming“ (Boehringer Mannheim)

**Plasmid-Mini-Prep, Plasmid-Maxi-Prep und EndoFree-Plasmid-Maxi-Prep** (Qiagen)

**Oligolabelling-Kit** (Pharmacia)

**Dye terminator cycle sequencing kit** (Perkin Elmer)

### 3.7 Sonstiges

**$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP**, spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol (Amersham)

**SuperFect-Transfektionsreagenz** (Qiagen)

**Lipofectamin-Transfektionsreagenz** (GIBCO BRL)

**Cell Culture Lysis Reagent** (Promega)

**Ampicillin** (Serva): 10 mg/ml in 50% Ethanol

---

**Nylonmembran ungeladen: „Qiabrane“ (Qiagen)**

**Röntgenfilm (Kodak)**

**Phosphor-Imager und Imaging-Plate (Fuji BAS 1000)**

**ABI-373A-DNA-Sequencer (Perkin-Elmer)**

**Luminometer (Berthold)**

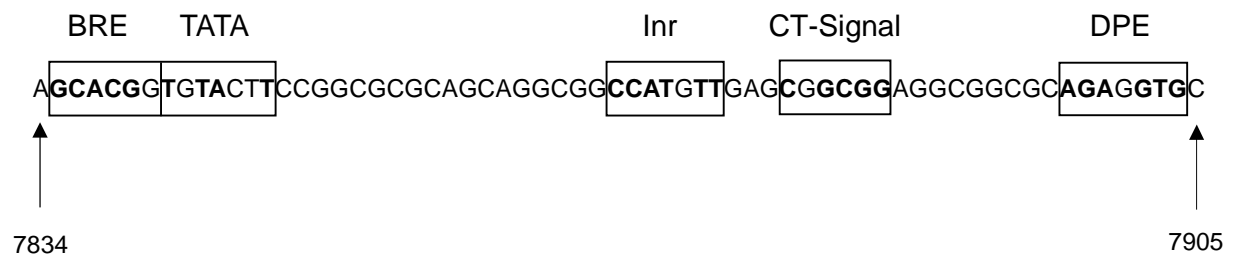
**DEAE-Zellulose-Membran: NA-45 (Schleicher & Schuell)**



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Core-Promotor-Region des *Fre2*-Gens

In der Umgebung des Transkriptionsstarts (Position 7890<sup>1</sup>; Eisel 1997) wurde nach Sequenzmotiven gesucht, die eine Übereinstimmung mit der Consensussequenz bekannter Core-Promotorelemente besitzen. Es fand sich ein Inr-Element (Smale & Baltimore 1989) bei Position 7872-78. Ein Element mit geringer Homologie zur TATA-Box-Consensussequenz (Orphanides *et al.* 1996) sowie ein „IIB recognition element“ (BRE; Lagrange *et al.* 1998), ein CT-Signal (Larsen *et al.* 1995) und ein „Downstream promoter element“ (DPE; Burke & Kadonaga 1996) wurden in einem in der Literatur als typisch beschriebenen Abstand zu diesem Inr-Element entdeckt. Unter der Voraussetzung, daß diesen Elementen eine funktionelle Bedeutung bei der Transkriptionsinitiation des *Fre2*-Gens zukommt, wäre jedoch ein Transkriptionsstart am Adenin-Nucleotid innerhalb des Inr-Elementes (Position 7874) zu erwarten.

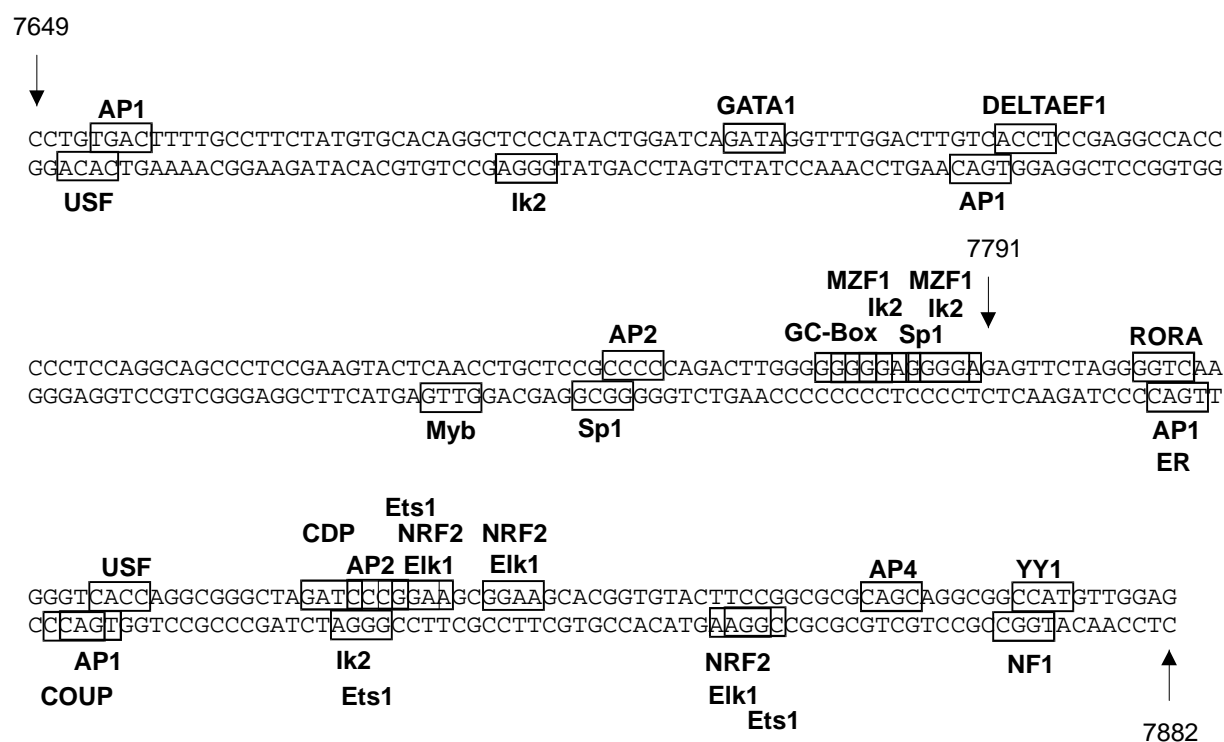


**Abbildung 3: Core-Promotor-Elemente in der Umgebung des Transkriptionsstartpunkts des *Fre2*-Gens: BRE: IIB recognition element; TATA: TATA-Box; Inr: Initiator-Element; CT-Signal; DPE: Downstream promoter element; Übereinstimmungen mit Consensussequenzen in Fettdruck**

<sup>1</sup> Alle Positionsangaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf den  $\lambda$ -Klon  $\lambda$ E-25.5-D.

## 4.2 Mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen in der potentiellen Promotor-Region des *Fre2*-Gens

Um aufgrund der DNA-Sequenz mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen im potentiellen Promotorbereich zu erkennen, wurde dieser Sequenzbereich mit dem Programm „MatInspector“ (Quandt *et al.* 1995) untersucht, das auf die Transkriptionsfaktor-Datenbank „Transfac“ (Heinemeyer *et al.* 1999) zurückgreift. Als Mindestvoraussetzung wurde eine Übereinstimmung der Core-Sequenz von 80% und der Matrix von 85% mit der Consensussequenz gefordert. Es ergaben sich folgende mögliche Bindestellen für sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren (Upstream-Promotor-Elemente):



**Abbildung 4:** Transkriptionsfaktor-Bindestellen (Core-Sequenz) im *Fre2*-Promotor nach den Ergebnissen einer Sequenzanalyse mit dem Programm „MatInspector“ (Quandt *et al.* 1995)

Um die mögliche funktionelle Bedeutung der einzelnen auf Sequenzebene gefundenen Transkriptionsfaktor-Bindestellen im potentiellen *Fre2*-Promotor abzuschätzen, wurde eine Literaturrecherche bezüglich der Eigenschaften der entsprechenden Transkriptionsfaktoren durchgeführt und die Ergebnisse in einer Übersichtstabelle zusammengefaßt.

Faktor	Struktur	Zelltypspezifität	Funktion	Referenz
YY1 (Yin-Yang 1)	Zink-Finger-Protein	ubiquitär	Initiator-Bindung Aktivator Repressor	Seto <i>et al.</i> (1991) Shi <i>et al.</i> (1991)
NF1/CTF (Nuclear factor 1)	CTD-ähnliches Motiv	ubiquitär	Aktivator	Xiao <i>et al.</i> (1994)
AP4 (Activating protein 4)	Helix-Loop-Helix-Domäne Leucinezipper	?	Aktivator	Hu <i>et al.</i> (1990)
Ets1	Ets-Domäne	T-Lymphozyten	Aktivator	Wasylyk <i>et al.</i> (1990) Thomas <i>et al.</i> (1997)
NRF2/GABP (Nuclear respiratory factor 2)	Ets-Domäne	ubiquitär	Aktivator	Skalnik (1991) Gugneja <i>et al.</i> (1996)
Elk1	Ets-Domäne	Lunge, Testis	Aktivator ternärer Komplex mit SRF Aktivierung durch Phosphorylierung	Rao <i>et al.</i> (1992) Rao <i>et al.</i> (1989) Marais <i>et al.</i> (1993)
AP2 (Activating protein 2)	basische DNA-Bindedomäne	ektodermale Zellen	RA-Induktion	Williams & Tjian (1991)
Ik2 (Ikaros 2)	Zink-Finger-Protein	lymphopoetische Zellen	Aktivator	Molnár & Georgopoulos (1994) Molnár (1996)
CDP/cut (CCAAT displacement protein)	Homöodomäne-Protein	ubiquitär	Repressor Regulation differentieller Genexpression in der Entwicklung	Maily <i>et al.</i> (1996)
USF (upstream stimulatory factor)	Helix-Loop-Helix-Domäne Leucinezipper	ubiquitär	Aktivator Interaktion mit TFII-I und TFIID methylierungssensitiv	Sawadogo (1988) Roy <i>et al.</i> (1991) Watt & Molloy (1988)
AP1 (Activating protein 1)	Jun/Fos-Heterodimer Leucinezipper	ubiquitär	Aktivator Apoptoseinduktion Induktion durch Wachstumsfaktoren (z. B. Epo)	Jacobs-Helber <i>et al.</i> (1998) Patel & Sytkowski (1995)
COUP-TF (Chicken ovalbumin gene upstream promoter-TF)	Steroid-Rezeptor-Superfamilie	verschiedene Gewebe, während Differenzierung und Organogenese	Repressor Aktivator	Leng <i>et al.</i> (1996) Wang <i>et al.</i> (1989) Bagchi <i>et al.</i> (1987)

Faktor	Struktur	Zelltypspezifität	Funktion	Referenz
ER (Östrogen-Rezeptor)	Hormon-Binde- domäne	?	hormonabhängiger Aktivator	Fawell <i>et al.</i> (1990) Danielian <i>et al.</i> (1992)
RORA (RAR-related orphan receptor alpha)	Steroid-Thyroid- Retinoid-Rezep- tor-Superfamilie	neurale Zellen	Aktivator Differenzierung neuraler Zellen	Giguere <i>et al.</i> (1994) Matsui <i>et al.</i> (1995)
MZF1 Myeloid zink finger protein	Zink-Finger- Protein	myeloide Zellen	Repressor in nicht- hämatopoetischen Zellen  Aktivator in häma- topoetischen Zellen  RA-Induktion	Hromas <i>et al.</i> (1991) Hromas <i>et al.</i> (1996)
Sp1	Zink-Finger- Protein	ubiquitär	Aktivator  Element TATA-loser Promotoren  Interaktion mit YY1 und GATA-1	Briggs <i>et al.</i> (1986) Merika & Orkin (1995) Seto <i>et al.</i> (1993)
Myb	Myb-DNA- Bindedomäne	hämatopoetische, epitheliale und andere nichthäma- topoetische Zellen	Regulation von Proliferation und Differenzierung	Ness (1996)
deltaEF1 delta-crystallin enhancer-binding protein	Zink-Finger- Homöodomäne- Protein	Myotom/Mesoderm während Embryoge- nese, Nervensystem, Augenlinse, lym- phoide Zellen	Repressor	Sekido <i>et al.</i> 1994 Funahashi <i>et al.</i> (1993)
GATA-1	Zink-Finger- Protein	erythroide Zellen, Sertoli-Zellen	Aktivator  Regulation der Ex- pression erythroid- spezifischer Gene  Apoptoseinhibition in erythroiden Vor- läuferzellen	Weiss & Orkin (1995)

**Tabelle 4:** Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren im Promotor des *Fre2*-Gens (RA:Retinsäure; RAR:Retinsäurerezeptor; SRF:Serum response factor)

### 4.3 Klonierung zweier Reportergenkonstrukte sowie eines positiven Kontrollvektors

Um die Funktionsfähigkeit des potentiellen Promotorbereichs zu testen, wurden zwei Reportergen-Vektoren mit verschiedenen langen Fragmenten dieses Promotors konstruiert. Ein 92 bp-Fragment (Position 7791-7882) und ein 234 bp-Fragment (Position 7649-7882) wurden in den Vektor pluci3 basic vor das Luciferase-Gen (*luc*) kloniert. Die im Luciferase-Assay gemes-

sene Luciferase-Aktivität diene als Maß für die Stärke des Promotors. Für einen positiven Kontrollvektor wurde der frühe Promotor des SV40-Virus in den Vektor *pluci3 basic* vor das *luc*-Gen kloniert.

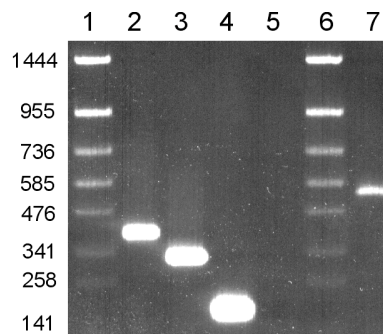
Die beiden Promotor-Fragmente des *Fre2*-Gens wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Als Template diene DNA des  $\lambda$ -Phagenklon 25.5.0 (Eisel 1997), der den *Fre2*-Locus als Insert enthält. Das 234-bp-Fragment (Insert 1) wurde mit den Primern 5'-Prom-1 und 3'-Prom-3 in einer 30 Zyklen umfassenden PCR mit einer Annealingtemperatur von 65°C synthetisiert. Für das 92-bp-Fragment (Insert 2) wurden die Primer 5'-Prom-2 und 3'-Prom-3 gewählt und eine PCR unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und nach Elution aus dem Gel mit Proteinase K, Klenow-Polymerase und Polynukleotidkinase behandelt.

Das SV40-Promotor-Fragment (401 bp) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III aus dem Vektor *pZeoSVLacZ* herausgeschnitten. Nach Aufreinigung im Agarosegel und nachfolgender Elution wurden die überhängenden Einzelstrangenden des Fragmentes mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und das Produkt mit Proteinase K behandelt.

Der Vektor *pluci3 basic* wurde mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bgl*III innerhalb der „multiple cloning site“ geschnitten. Die Vektorenden wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase zu doppelsträngigen Enden aufgefüllt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die drei Inserts wurden durch „blunt end“-Ligation in den Vektor kloniert.

Nach Transformation kompetenter Bakterien mit den Konstrukten wurden einzelne Bakterienklone mit Hilfe einer PCR auf das Vorliegen des Inserts in korrekter Orientierung innerhalb des Vektors getestet und das PCR-Produkt in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 5). In einer PCR mit den Primern pL-1 und pSV-1 von Klonen, die den Vektor mit dem SV40-Promotor-Fragment als Insert enthielten, entstand ein 387-bp-Produkt (Spur 2). Klone, die den Vektor mit Insert 1 als Plasmid enthielten, lieferten in der PCR mit den Primern pL-1 und 3'-Prom-3 ein Produkt mit einer Länge von 291 bp (Spur 3); Klone, die den Vektor mit Insert 2 enthielten, ergaben in der PCR ein 149-bp-Produkt (Spur 4). Um unspezifische Produkte zu identifizieren, die durch Annealing der Primer an bakterielle DNA-Sequenzen entstehen, wurde eine PCR mit untransformierten Bakterien durchgeführt (Spur 5). Ein unspezifisches Produkt aufgrund von Annealing an Vektorsequenzen wurde durch eine PCR eines Klons identifiziert, der als Plasmid den Vektor *pluci3 basic* ohne Insert enthielt (Spur 7). Die Entstehung dieses un-

spezifischen Produkts wurde in Anwesenheit von homologen Bindesequenzen jedoch unterdrückt (Spuren 2-4).

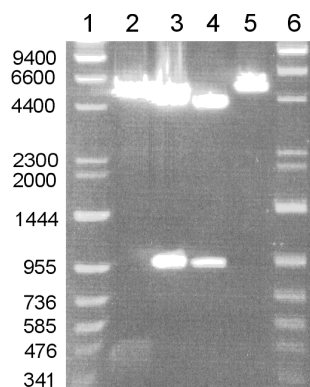


**Abbildung 5: PCR zum Screening einzelner Bakterienklone auf das Vorliegen des Reportergenvektors mit Insert in gewünschter Orientierung: 1 Längenstandard; 2 Klon I.SV40.1; 3 Klon I.1.11 (Insert 1); 4 Klon I.2.30 (Insert 2); 5 untransformierte Bakterien; 6 Längenstandard; 7 Transformation mit pluci3 basic**

Die Plasmid-DNA der Konstrukte wurde nun aus einer Kultur je eines einzelnen Bakterienklons isoliert, der in der PCR ein positives Ergebnis geliefert hatte.

Eine Testspaltung der Konstrukte I.1.11 (Insert 1) und I.2.30 (Insert 2) mit dem Restriktionsenzym *BstEII* ergab in der Auftrennung in einem Agarosegel Banden, die den aufgrund bekannter Schnittstellen berechneten Fragmentlängen entsprachen (Abb. 6): Für das Konstrukt I.1.11 wurden zwei Fragmente mit einer Länge von 4281 bp und 984 bp, für das Konstrukt I.2.30 Fragmentlängen von 4139 bp und 984 bp berechnet.

Das Konstrukt I.SV40.1 wurde mit dem Enzym *NcoI* geschnitten. Die Banden nach Auftrennung in der Elektrophorese entsprachen den berechneten Fragmentlängen von 5049 bp und 382 bp. Eine Spaltung des Vektors pluci3 basic mit *BstEII* ergab eine Linearisierung. Die Länge des Fragmentes entsprach der Vektorlänge von 5040 bp.

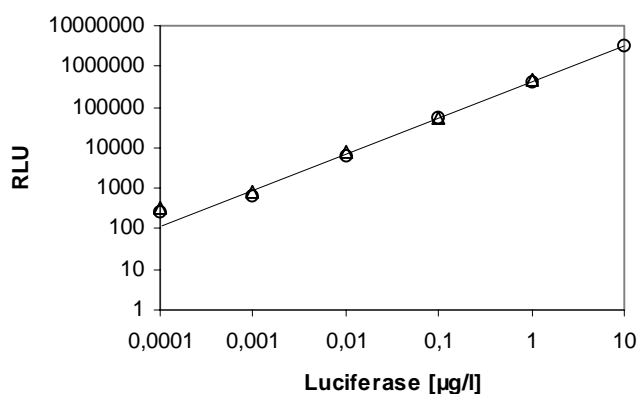


**Abbildung 6: Testspaltung der Plasmide: 1 Längenstandard; 2 I.SV40.1 mit *NcoI*; 3 I.1.11 mit *BstEII*; 4 I.2.30 mit *BstEII*; 5 pluci3 basic mit *BstEII*; 6 Längenstandard; elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel**

Zum Nachweis der korrekten Insertsequenz wurde eine Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte der Vektoren I.SV40.1, I.1.11 und I.2.30 durchgeführt.

#### 4.4 Luciferase-Assays

Der Luciferase-Assay wurde mit Hilfe eines Luminometers (Lumat LB 9501, Berthold) durchgeführt. Um für dieses Gerät den Meßbereich zu ermitteln, in dem die gemessene Lichtintensität in linearer Abhängigkeit zur Luciferase-Aktivität steht, wurde mittels gereinigter Luciferase eine Eichkurve erstellt. Über vier Größenordnungen zeigte sich Linearität (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Eichkurve zur Bestimmung des Meßbereiches, in dem die gemessene relative Lichtintensität (RLU) in linearer Abhängigkeit zur Menge an Luciferase steht; Probenvolumen 20 $\mu\text{l}$ , Meßzeit 10s

Eine Erhöhung der Meßzeit von 10s auf 30s ergab wie erwartet eine Verdreifachung der Meßwerte, so daß für diesen Zeitraum eine konstante Lichtreaktion anzunehmen ist.

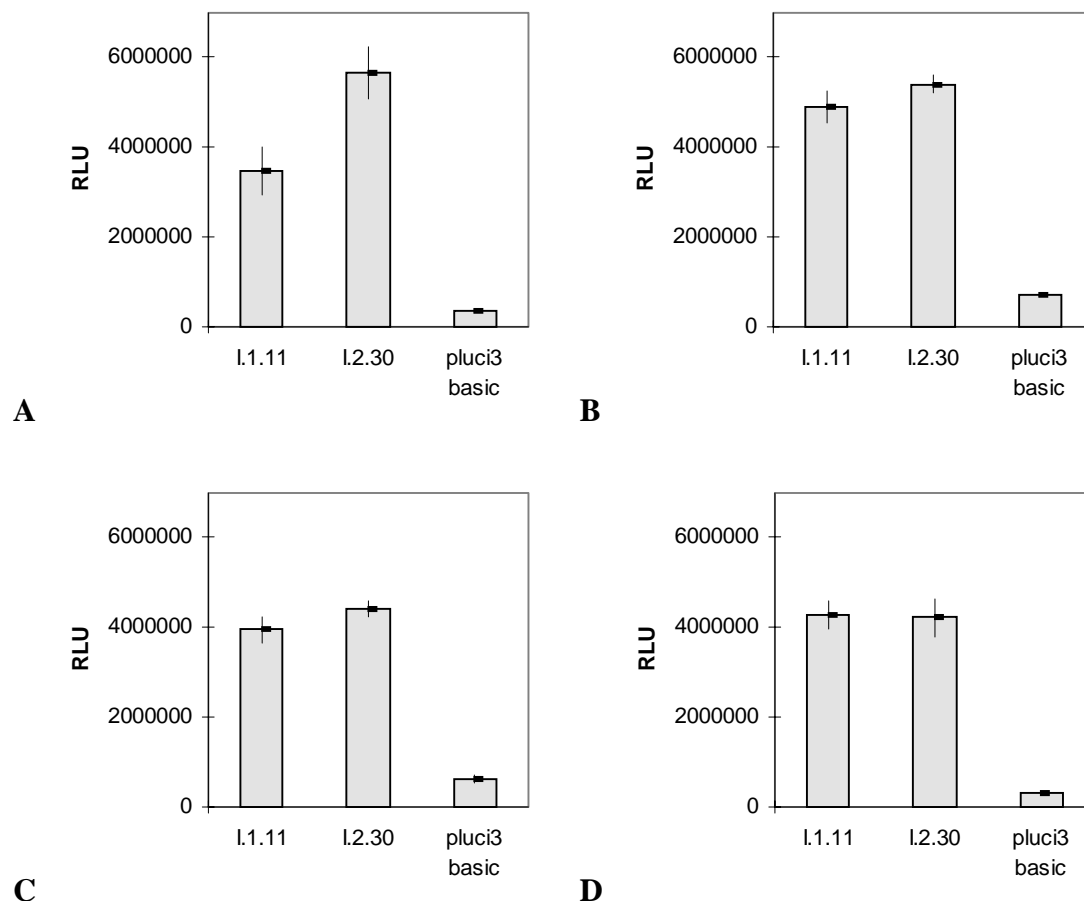
Zum Testen der beiden Promotorfragmente wurden die Vektoren I.1.11 (Insert 1) und I.2.30 (Insert 2) in Zellen der Fibroblastenzelllinie Rat-1 und sowie der hämatopoetischen Zelllinie HCD-57 transfiziert.

##### 4.4.1 Transfektion von Rat-1-Zellen

Zur Optimierung des Luciferase-Assays mit Rat-1-Zellen wurden eine Serie von vier Transfektionen mit je 2  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA und eine weitere Versuchsreihe mit je 1  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA durchgeführt. Zur Transfektion wurden jeweils die Vektoren I.1.11 (Insert 1; 234 bp), I.2.30 (Insert 2; 92 bp) und pluci3 basic (Negativkontrolle) verwendet.

#### 4.4.1.1 Variation der zur Transfektion eingesetzten DNA-Menge

Nach Transfektion der Zellen mit 2 µg DNA ergaben die anschließenden Luciferase-Assays (Versuchsreihe 1) hohe RLU-Werte zwischen  $3,5 \times 10^6$  und  $5,7 \times 10^6$  für die mit den Vektoren I.1.11 und I.2.30 transfizierten Zellen, während die mit dem Vektor pluci3 basic transfizierten Zellen im Luciferase-Assay Meßwerte zwischen  $3,1 \times 10^5$  und  $7,0 \times 10^5$  RLU ergaben (Abb. 8). Sowohl das 234-bp-Promotor-Fragment als auch das 92-bp-Fragment besitzen demnach eine deutliche Promotoraktivität, die sich in der beobachteten Expressionssteigerung des Reportergens gegenüber dem negativen Kontrollvektor zeigt. Bei drei von vier Versuchen lag der RLU-Wert für die I.2.30-transfizierten Zellen höher als der Wert für die I.1.11-transfizierten Zellen, jedoch war die Differenz der Meßwerte in zwei dieser drei Fälle gering.



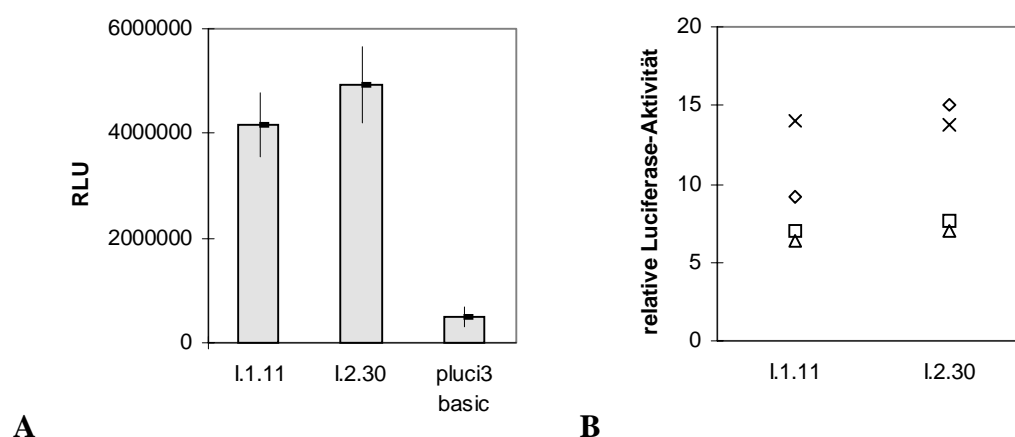
**Abbildung 8: A-D Relative Lichtintensität (RLU) als Maß der Luciferase-Aktivität in vier Luciferase-Assays nach Transfektion von Rat-1-Zellen mit je 2 µg Vektor-DNA (Versuchsreihe 1); jeweils Mittelwert und einfache Standardabweichung aus drei Einzelmessungen**

Der Mittelwert dieser vier Luciferase-Assays betrug  $4,2 \times 10^6$  RLU für I.1.11-transfizierte Zellen und  $4,9 \times 10^6$  RLU für Transfektionen mit dem Vektor I.2.30., die prozentuale Stan-



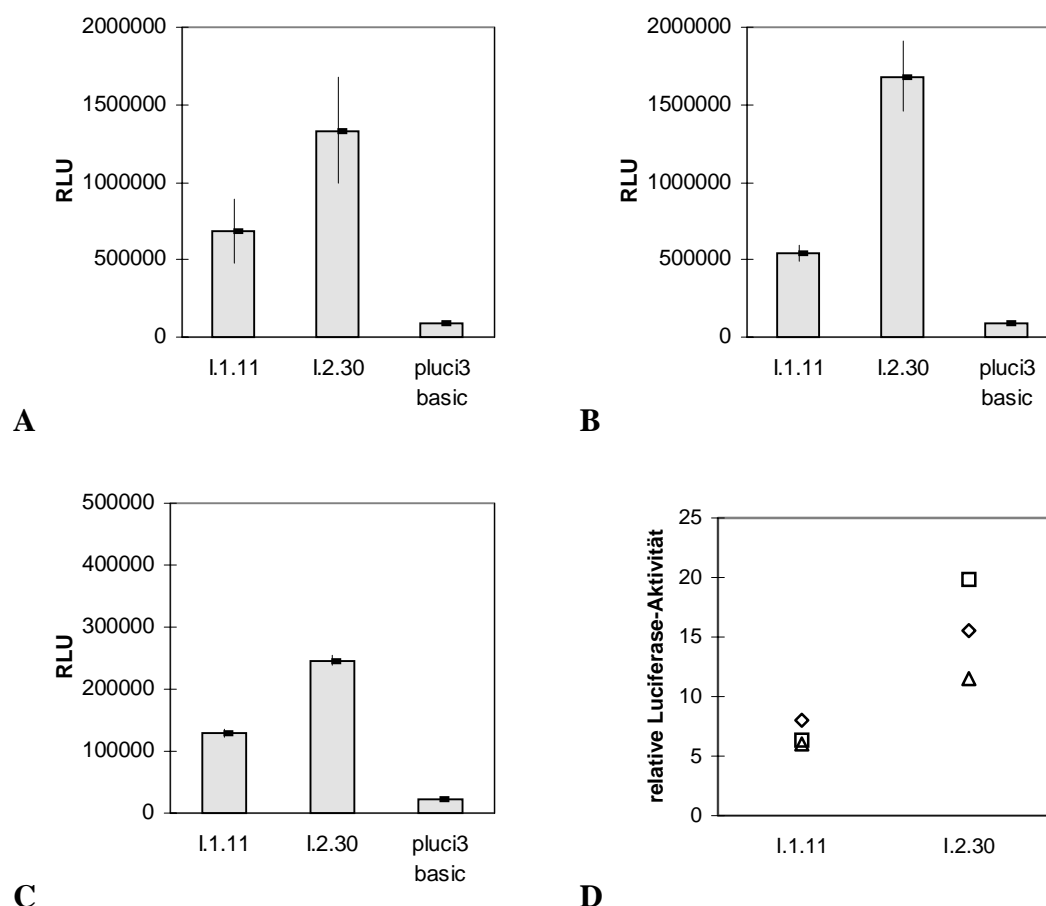
dardabweichung vom Mittelwert (Quotient aus einfacher Standardabweichung und Mittelwert) betrug 14,4% und 14,5% (Abb. 9A).

Die Luciferase-Aktivität gemessen in RLU war für Transfektion mit dem Konstrukt I.1.11 (234-bp-Fragment) um den Faktor 6,7 bis 14,0 höher als die für den Kontrollvektor pluci3 basic ohne Promotorelement. Für den Vektor I.2.30 (92-bp-Fragment) wurde eine um den Faktor 7,1 bis 15,0 höhere Luciferase-Aktivität als für den Kontrollvektor gefunden (Abb. 9B).



**Abbildung 9:** A Mittelwerte und einfache Standardabweichung der Luciferase-Aktivität gemessen in relativer Lichtintensität (RLU) der vier Luciferase-Assays nach Transfektion von Rat-1-Zellen mit je 2 µg Vektor-DNA; B Relative Luciferase-Aktivität der vier Versuche; gemessene RLU-Werte als Vielfaches des RLU-Wertes für den Vektor pluci3 basic ohne Promotorelement

Parallel zu den beschriebenen Transfektionen mit je 2 µg DNA wurden drei Transfektionen mit je 1 µg DNA durchgeführt und die Zellysate im Luciferase-Assay auf ihre Luciferase-Aktivität getestet (Versuchsreihe 2; Abb. 10A-C). Hierbei fiel bei insgesamt niedrigeren Meßwerten ein Unterschied zwischen den beiden unterschiedlich langen Promotorfragmenten auf. In allen drei Versuchen lagen die Werte für die mit dem Vektor I.2.30 transfizierten Zellen über denen der mit dem Vektor I.1.11 transfizierten Zellen. Es traten jedoch deutliche Schwankungen der Höhe der Meßwerte von Versuch zu Versuch auf, so daß eine Mittelwertberechnung der RLU-Werte nicht sinnvoll erschien. In Relation zum Vektor pluci3 basic ergaben sich für den Vektor I.1.11 (234-bp-Fragment) eine Steigerung der Luciferase-Aktivität um den Faktor 6,0 bis 8,0, für den Vektor I.2.30 (92-bp-Fragment) um den Faktor 11,5 bis 13,8 (Abb. 10D).



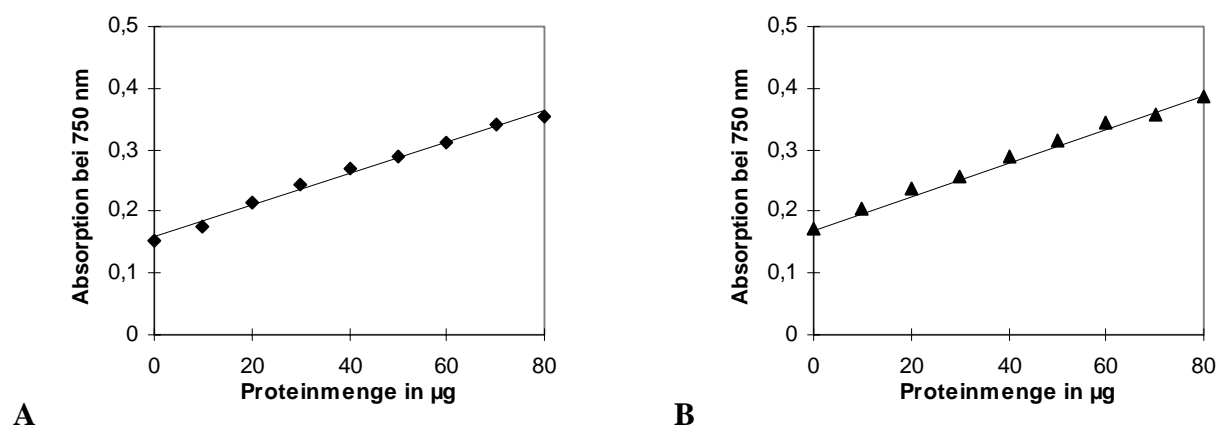
**Abbildung 10:** A-C Relative Lichtintensität (RLU) als Maß der Luciferase-Aktivität in drei Luciferase-Assays nach Transfektion von Rat-1-Zellen mit je 1 µg Vektor-DNA (Versuchsreihe 2); jeweils Mittelwert und einfache Standardabweichung aus drei Einzelmessungen; D Relative Luciferase-Aktivität der drei Versuche; gemessene RLU-Werte als Vielfaches des RLU-Wertes für den Vektor pluci3 basic ohne Promotorelement

#### 4.4.1.2 Normierung auf den Proteingehalt der Zellysate

Eine mögliche Erklärung für Schwankungen der Meßwerte für die Luciferase-Aktivität von Versuch zu Versuch wären Differenzen in der Anzahl an Zellen, die für den Luciferase-Assay eingesetzt wurden, obwohl konstante Zellzahlen zur Transfektion eingesetzt wurden und die Kulturschalen vor der Lyse der Zellen konfluent bewachsen waren. Um die Relevanz dieser möglichen Fehlerquelle abschätzen zu können, wurde eine Bestimmung des Proteingehalts der Zellysate mit der Methode nach Lowry (Lowry 1951) als Maßstab für die Zellzahl durchgeführt.

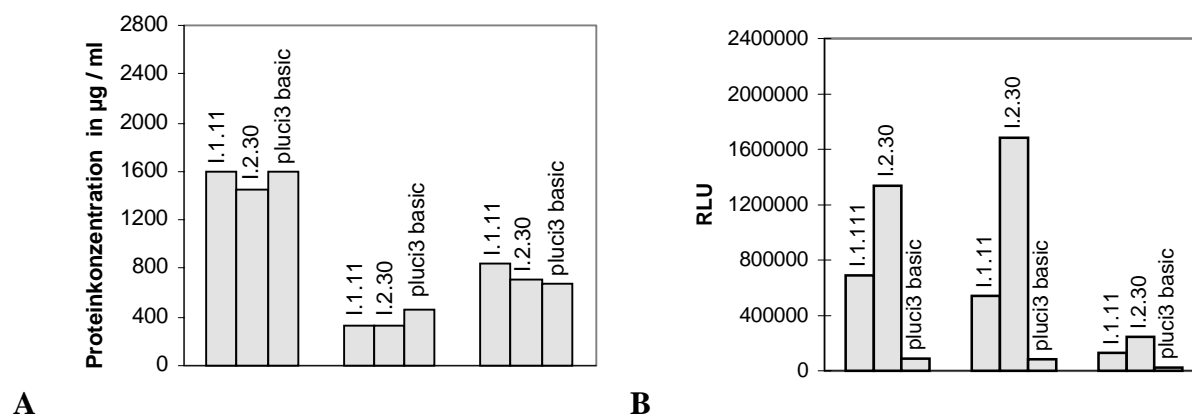
Um eine Beeinflussung der Linearität der Absorptionswerte durch den Zellysepuffer auszuschließen, wurde zunächst eine Eichkurve angelegt. In Gegenwart von bis zu 20 µl Lysepuffer

im Reaktionsansatz von 5 ml ergab sich eine lineare Abhängigkeit der gemessenen Absorption von der eingesetzten Proteinmenge (Abb. 11).



**Abbildung 11: Eichkurven für die Proteinbestimmung; A in Gegenwart von 10 µl Zellysepuffer; B in Gegenwart von 20 µl Zellysepuffer**

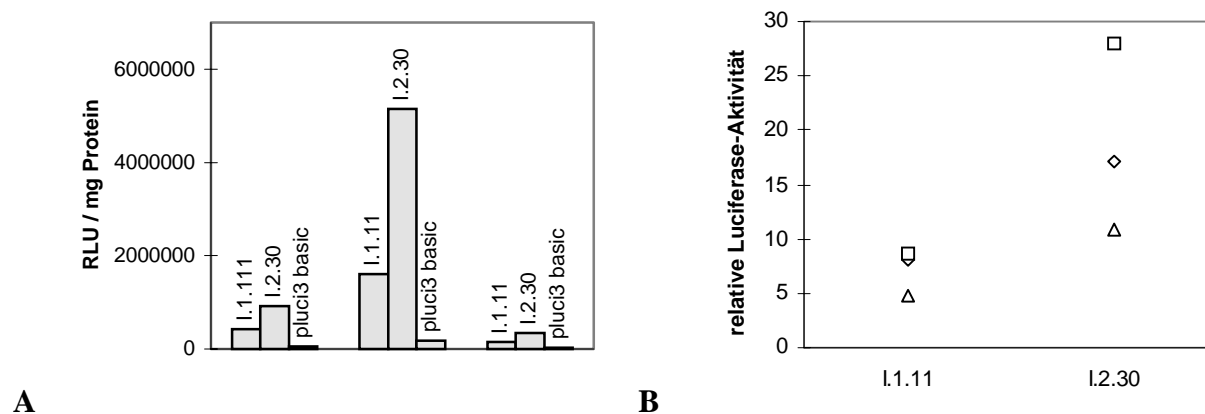
Die Bestimmung der Proteinmenge der Zellysate aus Versuchsreihe 2 (Abb. 12A) ergab Proteinkonzentrationen zwischen 330 µg/ml und 1600 µg/ml. Die Proteinkonzentration schwankte zwischen den drei Versuchen maximal um den Faktor 4,8. Innerhalb der einzelnen Versuche betrug die prozentuale Standardabweichung vom jeweiligen Mittelwert der Proteinkonzentration 5,6%, 20,2% und 12,2%.



**Abbildung 12: A Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellysaten der Versuchsreihe 2; B Mittelwerte der in RLU gemessenen Luciferase-Aktivität der Versuchsreihe 2**

Es ergab sich keine eindeutige Korrelation hoher Luciferasewerte mit hohen Proteinkonzentrationen im Zellysat. Schwankungen der Luciferase-Aktivität von Versuch zu Versuch waren vermutlich von weiteren Faktoren abhängig, die durch die Bestimmung der Proteinkonzentration nicht erfasst wurden. Deshalb führte eine Normierung der Luciferase-Aktivität auf den Proteingehalt der Zellysate nicht zur Korrektur dieser Schwankungen (Abb. 13 A). Die rela-

tive Luciferase-Aktivität unterlag nach Normierung auf den Proteingehalt der Zellysate einer stärkeren Streuung als zuvor. Für die Transfektion mit dem Vektor I.1.11 ergab sich eine Steigerung der Luciferase-Aktivität um den Faktor 4,8 bis 8,7 gegenüber der Transfektion mit dem Vektor pluci3 basic, für Transfektionen mit dem Vektor I.2.30 eine Steigerung um den Faktor 10,9 bis 28,1 (Abb. 13 B).



**Abbildung 13: A** Mittelwerte der in RLU gemessenen Luciferase-Aktivität der Versuchsreihe 2 nach Normierung auf den Proteingehalt der Zellysate; **B** Relative Luciferase-Aktivität der Versuchsreihe 2 nach Normierung auf den Proteingehalt der Zellysate; gemessene RLU-Werte als Vielfaches des RLU-Wertes für den Vektor pluci3 basic ohne Promotorelement

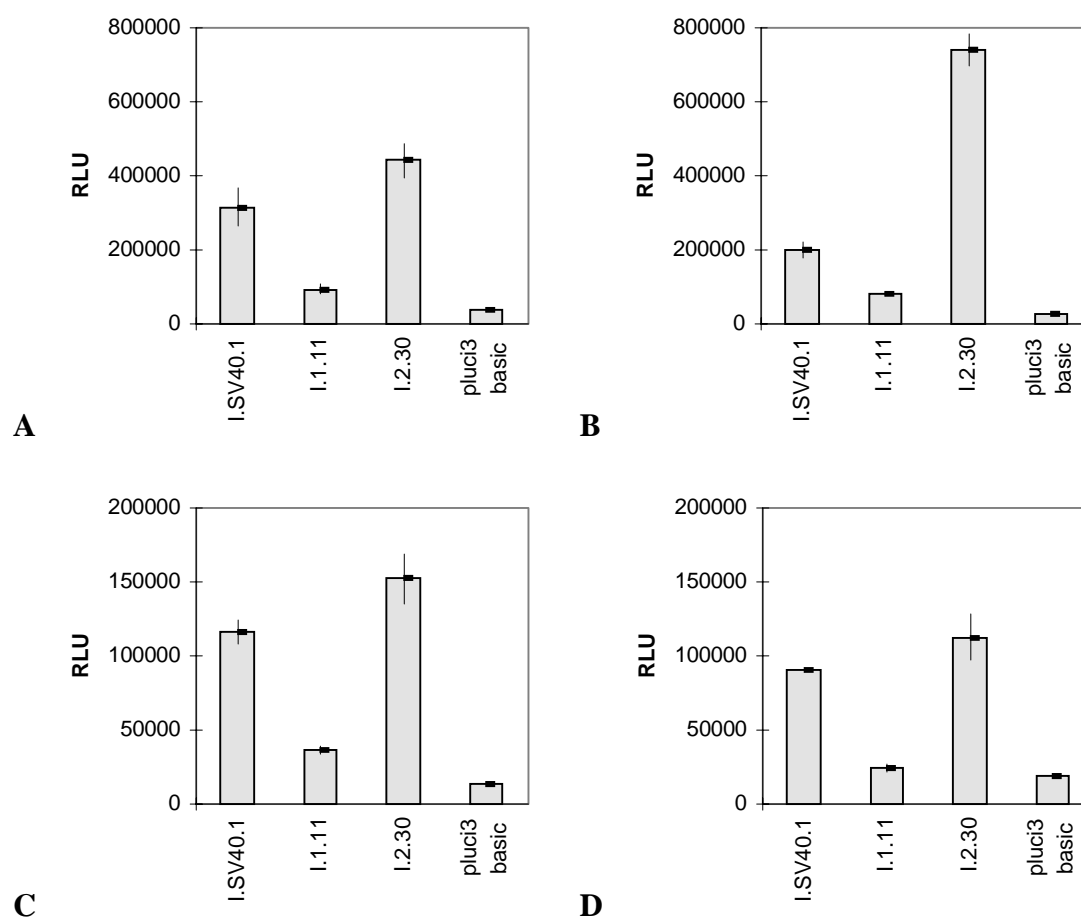
#### 4.4.1.3 Cotransfektion mit dem $\beta$ -Galaktosidase-Vektor pZeoSVLacZ

Um den Einfluß der Transfektionseffizienz auf die Ergebnisse der Luciferase-Assays abschätzen zu können, wurde eine Cotransfektion mit den Luciferase-Vektoren und dem  $\beta$ -Galactosidase-Vektor pZeoSVLacZ durchgeführt. Der  $\beta$ -Galactosidase-Vektor enthielt den frühen SV40-Promotor/Enhancer, der eine Expression des *lacZ*-Gens in zahlreichen Zelltypen gewährleistet. Unter der Annahme, daß eine gleichzeitige Transfektion mit zwei Vektoren für beide Vektoren mit gleicher Effizienz erfolgt, kann über die Messung der exprimierten  $\beta$ -Galactosidase eine Korrektur der gemessenen Luciferase-Aktivität bezüglich der Transfektionseffizienz durchgeführt werden.

Es wurden je 1  $\mu$ g des entsprechenden Luciferase-Vektors und 1  $\mu$ g des  $\beta$ -Galactosidase-Vektors pZeoSVLacZ cotransfiziert (Versuchsreihe 3). Eine Reduktion der DNA-Menge des Vektors pZeoSVLacZ auf 0,5  $\mu$ g war aufgrund der geringen Sensitivität des zur Verfügung stehenden Nachweisverfahrens für  $\beta$ -Galactosidase nicht möglich. Als Positivkontrolle und

interner Standard wurde ein zusätzlicher Luciferase-Vektor I.SV40.1 eingesetzt, der den frühen SV40-Promotor enthält.

Für den Vektor I.SV40.1 wurden Werte zwischen  $9,1 \times 10^4$  und  $3,1 \times 10^5$  RLU gemessen, für den Vektor I.1.11 zwischen  $2,5 \times 10^4$  und  $9,4 \times 10^4$  RLU und für den Vektor I.2.30 zwischen  $1,1 \times 10^5$  und  $7,4 \times 10^5$  RLU. Der Hintergrund des Vektors pluci3 basic, der kein Promotorelement enthält, lag bei  $1,3 \times 10^4$  bis  $3,5 \times 10^4$  RLU. Es fiel auf, daß die Meßwerte insgesamt deutlich niedriger waren als in den vorausgegangene Versuchen ohne Cotransfektion und für den Vektor I.1.11 sehr niedrige RLU-Werte gemessen wurden, die nur wenig über dem Hintergrund des Vektors pluci3 basic lagen. Insbesondere für den Vektor I.2.30 streuten die Meßwerte stark (Abb. 14).



**Abbildung 14: Luciferase-Aktivität gemessen als relative Lichtintensität (RLU) in vier Luciferase-Assays mit Rat-1-Zellen nach Transfektion mit je 1 µg Luciferase-Vektor-DNA und 1 µg pZeoSVLacZ-DNA (Versuchsreihe 3); jeweils Mittelwert und einfache Standardabweichung aus drei Einzelmessungen**

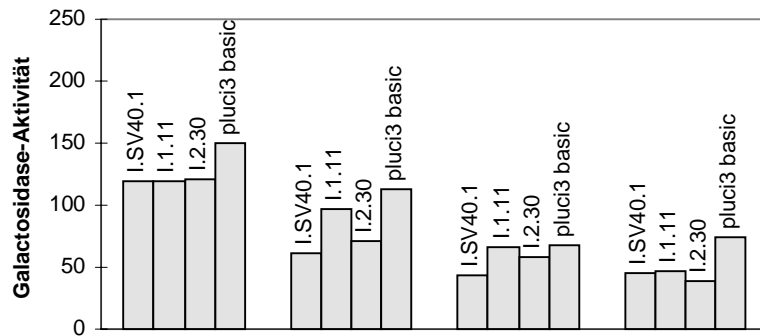


Abbildung 15:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität gemessen als relative Einheiten (Absorption bei 420 nm x 100 pro Stunde Inkubation und 150  $\mu$ l Zellysat) in vier Versuchen mit Rat-1-Zellen nach Transfektion mit je 1  $\mu$ g Luciferase-Vektor-DNA und 1  $\mu$ g pZeoSVLacZ-DNA (Versuchsreihe 3)

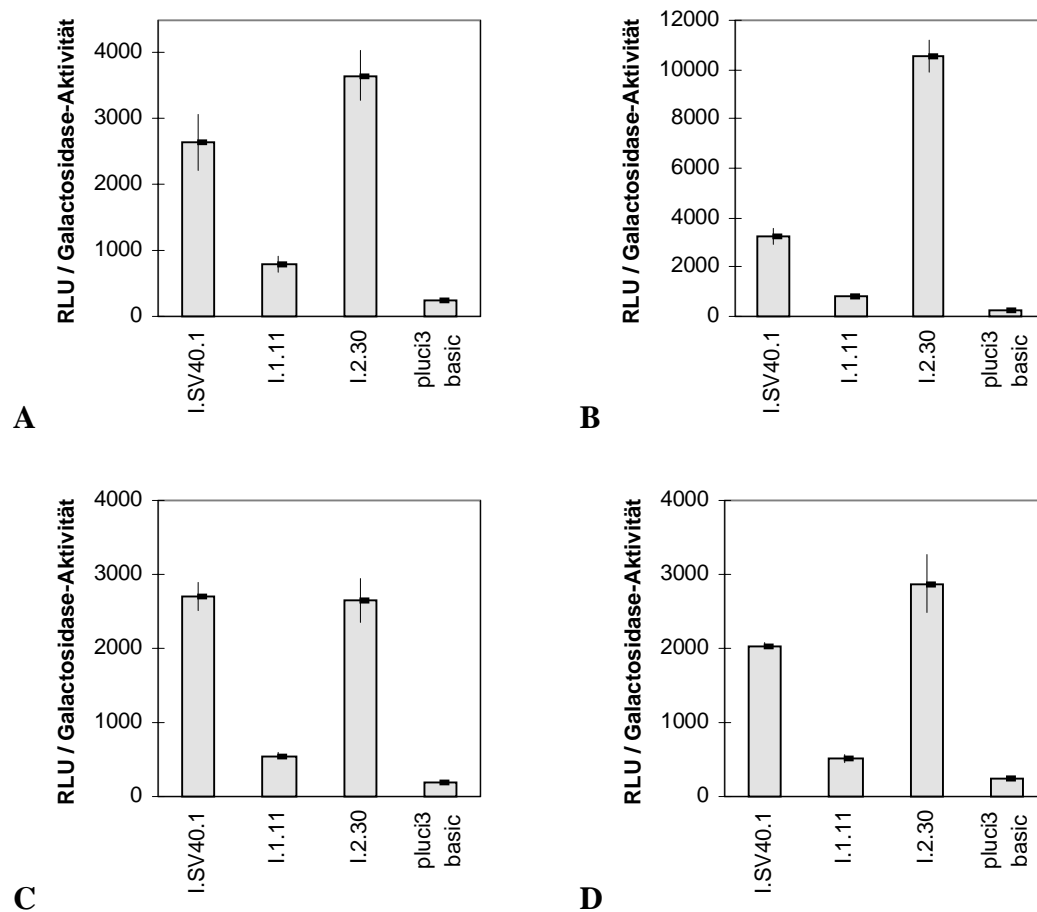
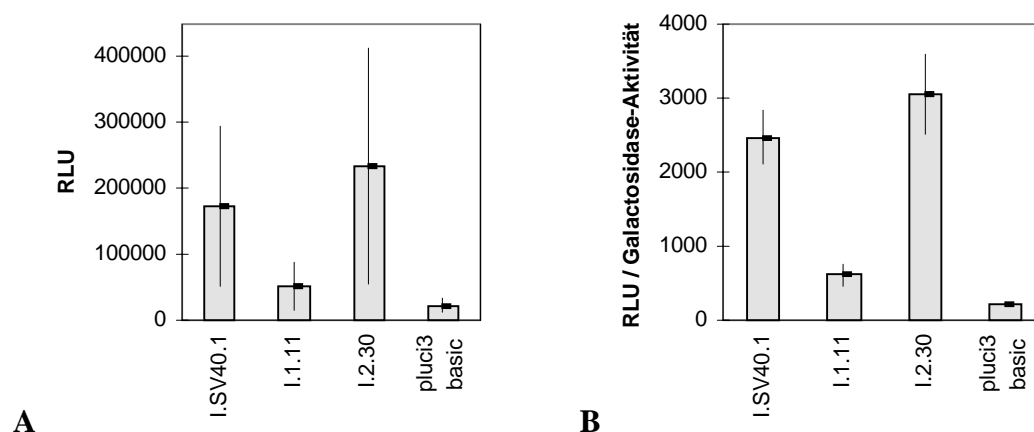


Abbildung 16: Luciferase-Aktivität gemessen als relative Lichtintensität (RLU) korrigiert auf  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität (Absorption bei 420 nm x 100 pro Stunde Inkubation und 150  $\mu$ l Zellysat) in vier Luciferase-Assays mit Rat-1-Zellen nach Transfektion mit je 1  $\mu$ g Luciferase-Vektor-DNA und 1  $\mu$ g pZeoSVLacZ-DNA (Versuchsreihe 3); jeweils Mittelwert und einfache Standardabweichung aus drei Einzelmessungen

Die bestimmten  $\beta$ -Galactosidase-Werte lagen im Bereich von 43 bis 151 relativen Einheiten (Absorption bei 420 nm x 100 pro Stunde Inkubation und 150  $\mu$ l Zellysats), d.h. die gemessene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität variierte zwischen den einzelnen Versuchen maximal um den Faktor 3,5. Innerhalb eines Versuches waren die Werte für die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität relativ konstant. Die prozentuale Standardabweichung vom jeweiligen Mittelwert der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität eines Versuches betrug 12,3%, 27,7%, 19,5% und 30,7% (Abb. 15).

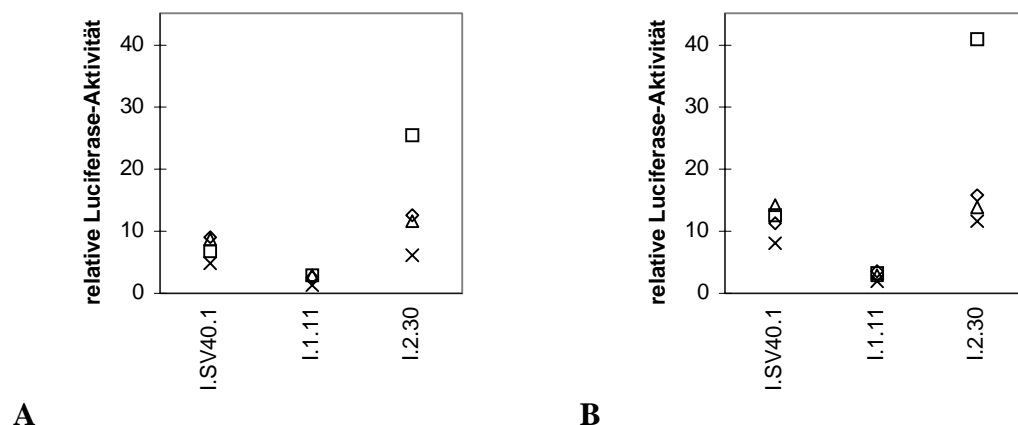
Die gemessene Luciferase-Aktivität wurde durch den Meßwert für die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in demselben Zellysats dividiert. Auf diese Weise sollte eine Korrektur der Luciferase-Meßwerte bezüglich Differenzen in der Transfektionseffizienz erzielt werden. Es zeigte sich eine Verringerung der Streubreite der Luciferase-Meßwerte (Abb. 16) mit Ausnahme des Wertes für den Vektor I.2.30 in Versuch 2 (Abb. 16 B), der etwa um den Faktor drei höher lag als die entsprechenden Werte in den drei anderen Versuchen.

Die Gegenüberstellung einer Darstellung der Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung vor und nach Normierung der Luciferase-Aktivität auf die gemessene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität zeigte eine deutliche Reduktion der Standardabweichung nach Normierung (Abb. 17A und 17B).



**Abbildung 17: Mittelwerte und einfache Standardabweichung der Luciferase-Aktivität gemessen in relativer Lichtintensität (RLU) der Luciferase-Assays nach Transfektion von Rat-1-Zellen mit je 1  $\mu$ g Luciferase-Vektor-DNA und 1  $\mu$ g des Vektors pZeoSVLacZ; Nichtberücksichtigung des zweiten Versuches mit stark abweichenden Werten für den Vektor I.2.30; A vor Normierung; B nach Normierung auf  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität**

Die relative Luciferase-Aktivität entsprach nach Normierung der RLU-Werte auf die gemessene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität etwa der berechneten relativen Luciferase-Aktivität vor Normierung (Abb. 18).

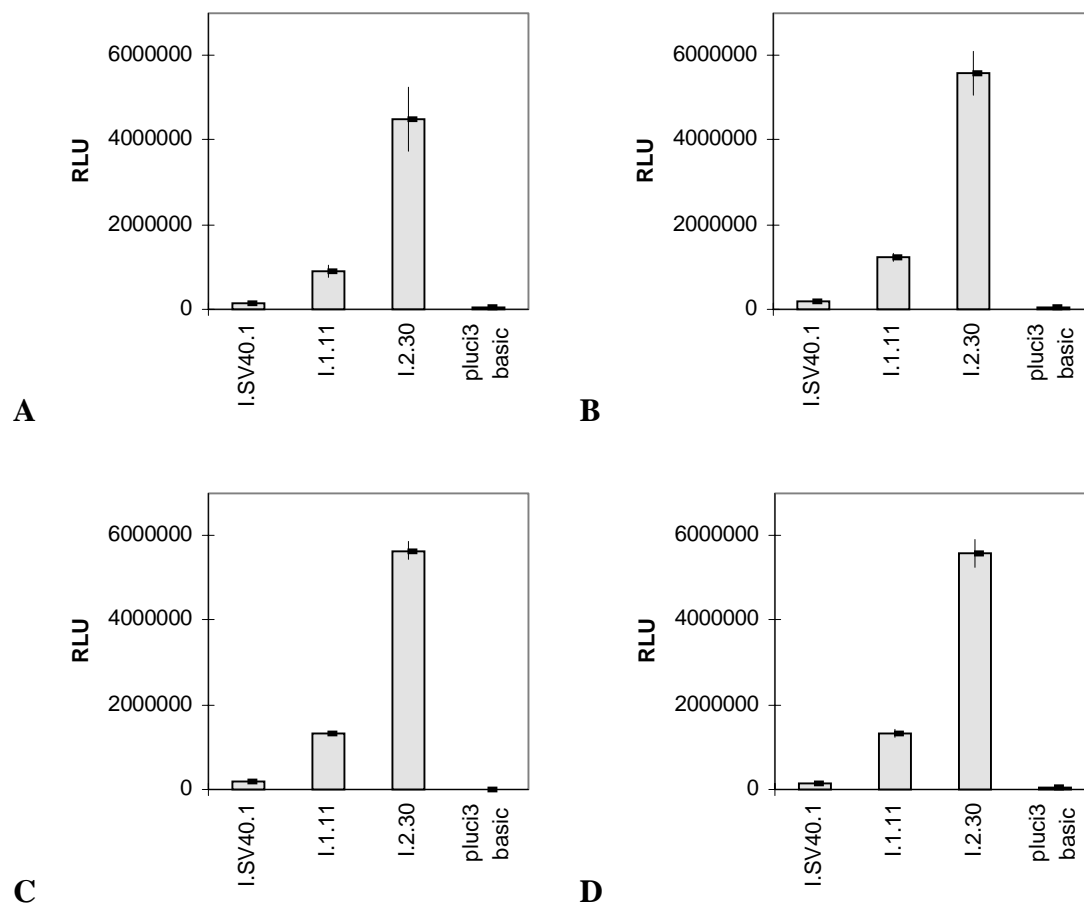


**Abbildung 18: Relative Luciferase-Aktivität der vier Versuche aus Versuchsreihe 3; gemessene RLU-Werte als Vielfaches des RLU-Wertes für den Vektor pluci3 basic ohne Promotorelement. A: Vor Normierung der Luciferasewerte auf  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität; B: Nach Normierung auf  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität**

#### 4.4.1.4 Vergleich mit einem SV40-Promotor-Kontrollvektor

Um einen Standard für die Stärke der getesteten Promotorfragmente zu haben, wurde eine weitere Versuchsreihe unter Einschluß einer Transfektion mit dem Luciferase-Vektor I.SV40.1 durchgeführt, der den SV40-Promotor/Enhancer enthielt (Versuchsreihe 4; Abb. 19). Für den Vektor I.SV40.1 wurden Werte zwischen  $1,3 \times 10^5$  und  $1,9 \times 10^5$  RLU gemessen, für den Vektor I.1.11 zwischen  $9,0 \times 10^5$  und  $1,3 \times 10^6$  RLU und für den Vektor I.2.30 zwischen  $4,5 \times 10^6$  und  $5,6 \times 10^6$  RLU. Der Hintergrund des negativen Kontrollvektors pluci3 basic wurde mit  $2,2 \times 10^4$  bis  $3,8 \times 10^4$  RLU bestimmt. Auffällig war, daß deutlich höhere RLU-Werte als in den Vorversuchen gemessen wurden, in denen ebenfalls  $1 \mu\text{g}$  DNA zur Transfektion verwendet wurde. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit der Verwendung eines neuen Ansatzes des Zellkulturmedium und verbesserten Wachstumsbedingungen der Zellen. Die Schwankungen der RLU-Werte von Versuch zu Versuch waren geringer als in vorausgegangenen Versuchen.

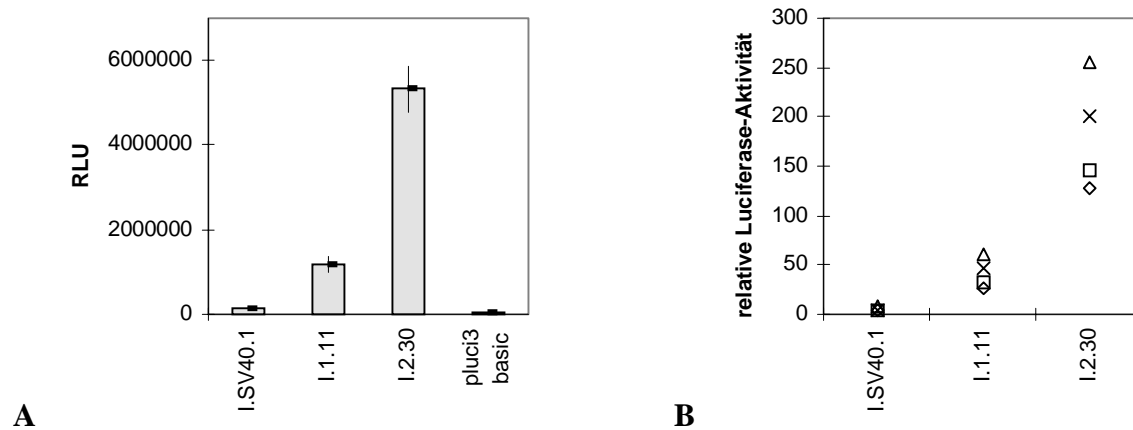




**Abbildung 19: Relative Lichtintensität (RLU) als Maß der Luciferase-Aktivität in vier Luciferase-Assays nach Transfektion von Rat-1-Zellen mit je 1 µg Vektor-DNA (Versuchsreihe 4); neuer Ansatz des Kulturmediums; jeweils Mittelwert und einfache Standardabweichung aus drei Einzelmessungen**

Bei diesen vier Luciferase-Assays errechnete sich ein Mittelwert von  $1,6 \times 10^5$  RLU für mit dem Vektor I.SV40.1 transfizierte Zellen, von  $1,2 \times 10^6$  RLU für Transfektionen mit dem Vektor I.1.11 und von  $5,3 \times 10^6$  RLU für I.2.30-transfizierte Zellen. Die prozentualen Standardabweichungen vom jeweiligen Mittelwert betrugen 17,5%, 16,4% und 10,3% (Abb. 20A).

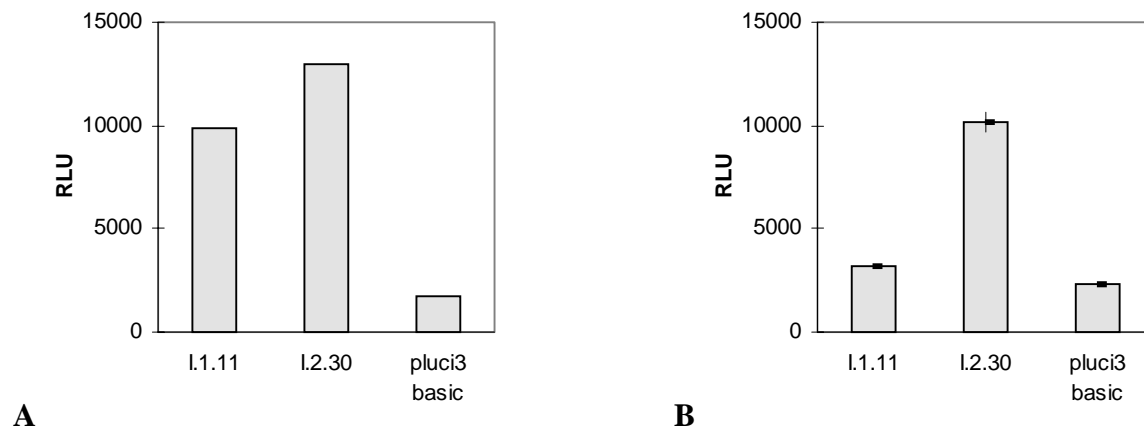
Für Transfektionen mit dem Konstrukt I.SV40.1 war die Luciferase-Aktivität gemessen in RLU um den Faktor 4,1 bis 8,7 höher als die für den Kontrollvektor pluci3 basic ohne Promotorelement, für Transfektionen mit dem Vektor I.1.11 (234-bp-Fragment) um den Faktor 25,7 bis 59,8. In Zellen, die mit dem Vektor I.2.30 (92-bp-Fragment) transfiziert wurden, war die gemessene Luciferase-Aktivität 127,8- bis 255,0-fach erhöht gegenüber dem Vektor pluci3 basic (Abb. 20B).



**Abbildung 20:** A Mittelwerte und einfache Standardabweichung der Luciferase-Aktivität gemessen in relativer Lichtintensität (RLU) der vier Luciferase-Assays nach Transfektion von Rat-1-Zellen mit je 1 µg Vektor-DNA (Versuchsreihe 3); B Relative Luciferase-Aktivität der vier Versuche; gemessene RLU-Werte als Vielfaches des RLU-Wertes für den Vektor pluci3 basic ohne Promotorelement

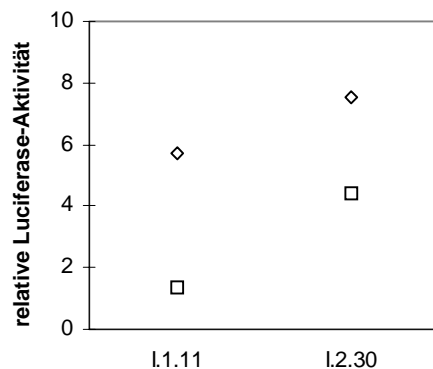
#### 4.4.2 Transfektion von HCD-57-Zellen

In den vorausgegangenen Versuchen wurde der putative *Fre2*-Promotor zunächst mittels Reporter-gen-Assay nach Transfektion von Fibroblasten (Rat-1) getestet. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf hämatopoetische Zellen zu prüfen, wurden HCD-57-Zellen mit den Vektoren I.1.11 und I.2.30 transfiziert und nachfolgend im Luciferase-Assay die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die gemessenen RLU-Werte lagen um den Faktor 1000 niedriger als nach Transfektion von Rat-1-Zellen, was auf eine sehr niedrige Transfektionseffizienz zurückzuführen war. Für den Vektor I.1.11 wurden Werte von  $9,9 \times 10^3$  und  $3,2 \times 10^3$  RLU gemessen, für den Vektor I.2.30  $1,3 \times 10^4$  und  $1,0 \times 10^4$  RLU. Der negative Kontrollvektor pluci3 basic ergab einen Hintergrund von  $1,7 \times 10^3$  und  $2,3 \times 10^3$  RLU (Abb. 21). In beiden Versuchen war der Meßwert für den Vektor I.2.30 höher als der für den Vektor I.1.11, was mit den Ergebnissen der Versuche mit Fibroblasten übereinstimmte.



**Abbildung 21: Relative Lichtintensität (RLU) als Maß der Luciferase-Aktivität in zwei Luciferase-Assays nach Transfektion von HCD-57-Zellen mit je 3 µg Vektor-DNA (Versuchsreihe 5); A Einzelmessung; B Mittelwert und einfache Standardabweichung zweier Einzelmessungen**

Die relative Luciferase-Aktivität lag für den Vektor I.1.11 um den Faktor 1,4 bzw. 5,7 über der des Vektors pluci3 basic ohne Promotorelement, für den Vektor I.2.30 um den Faktor 4,4 bzw. 7,5 (Abb. 22).



**Abbildung 22: Relative Luciferase-Aktivität der zwei Versuche; gemessene RLU-Werte als Vielfaches des RLU-Wertes für den Vektor pluci3 basic ohne Promotorelement**

#### 4.5 Versuche zur Herstellung einer DNA-Sonde zur Colony-Hybridisierung einer genomischen Cosmid-Bibliothek

Da die vollständige Sequenz des Intron 2 des *Fre2*-Gens noch nicht bekannt ist, sollte eine geeignete Sonde aus der bekannten Sequenz des Exon 3 (628 bp) zum Screenen einer Cosmid-Bibliothek auf einen Klon, der das Intron 2 komplett enthält, gefunden werden. Ein mit Hilfe der PCR hergestelltes DNA-Fragment mit einer Länge von 615 bp enthielt fast das ge-

samte Exon 3. In der Hybridisierung (Digoxigenin-System) eines Colony-Blots der Cosmid-Bibliothek ergab sich jedoch ein ungewöhnlich hoher Anteil vermeintlich positiver Klone, die in einer PCR mit den beiden Sondenprimern jedoch kein spezifisches Produkt ergaben. Nachdem Veränderungen der Hybridisierungsbedingungen keine Verbesserung ergaben und eine Sequenzanalyse der Sondensequenz mit der Datenbank „BLAST“ Hinweise auf repetitive Sequenzen v. a. im 5'-Abschnitt ergaben, wurde durch Schneiden der Sonde mit dem Restriktionsenzym *Bgl*III versucht, repetitive Abschnitte zu eliminieren. Diese neue Sonde mit 293 bp Länge wurde nun zunächst an einem Southern-Blot (zur Verfügung gestellt von M. Veit) getestet, wo die Lokalisation der zu erwartenden Bande bekannt war. Um die Verwendung des Digoxigenin-Systems als mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wurde die Hybridisierung mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde durchgeführt. Das Ergebnis war eine schwache spezifische Hybridisierungsbande bei hoher unspezifischer Bindung der markierten Sonde an DNA in den Laufspuren trotz Absättigung des Blots mit sonifizierter Maus-DNA (Abb. 23), so daß sich hierdurch die hohe Anzahl falsch positiver Klone erklärt. Eine Sonde aus der Sequenz des Exon 3 ist zum Colony-Screening einer Cosmid-Genbank somit eher ungeeignet, und es muß eine andere Strategie entwickelt werden, wie ein Klon mit der Exon-3-Sequenz isoliert werden kann.

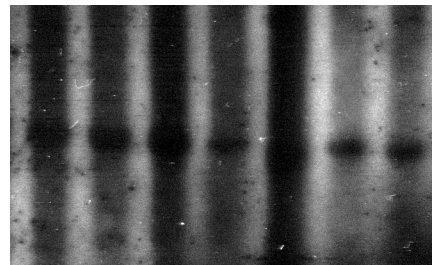


Abbildung 23: Southern-Hybridisierung mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten 293-bp-Sonde aus dem 3'-Bereich des Exon 3

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Core-Promotor-Region des *Fre2*-Gens

Der Transkriptionsstartpunkt des *Fre2*-Gens wurde durch Sequenzierung von cDNA-Klonen bei Position 7890 (bezogen auf den  $\lambda$ -Klon  $\lambda$ E-25.5-D) bestimmt (Eisel 1997). An diesem Startpunkt findet sich jedoch weder ein Inr-Element noch ist eine TATA-Box in typischer Position etwa 25-30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstart vorhanden (Eisel 1997). Als Erklärung wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, es könne sich um ein sogenanntes Haushaltsgen (housekeeping gene) handeln, das einen Promotor ohne TATA-Box und eine GC-reiche Region besitzt (Smale & Baltimore 1989). TATA-lose Promotoren verfügen jedoch in der Regel über ein Inr-Element, da TATA-Box, Inr-Element oder beide Elemente für den Aufbau des Initiationskomplexes benötigt werden (Larsen *et al.* 1995). In einer Alternativhypothese wird erwogen, ob der tatsächliche Transkriptionsstart überhaupt gefunden wurde (Eisel 1997).

Zur Klärung der Frage, ob der Abschnitt stromaufwärts des vermuteten Transkriptionsstarts Promotorfunktion besitzt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Reporter-gen-Assay durchgeführt, der eindeutig eine Promotoraktivität nachwies. Daraufhin wurde nochmals eine Analyse der Sequenz auf Core-Promotor-Elemente durchgeführt. Ein erster Hinweis auf ein potentielles Inr-Element ergab sich durch die Entdeckung einer möglichen Bindestelle des Transkriptionsfaktors YY1 bei Position 7872-7878, der an die Initiator-Sequenz binden kann und dort als Aktivator wirkt (Seto *et al.* 1991). Die Hypothese, daß der tatsächliche Transkriptionsstart (+1) innerhalb dieses Inr-Elementes bei Position 7874 liegt, wird gestützt durch die Entdeckung weiterer Core-Promotor-Elemente in typischem Abstand zum Inr-Element: Eine potentielle TATA-Box mit der Sequenz T-G-T-A-C-T-T liegt bei Position 7841-47 (+22-+28), wie gewöhnlich beschrieben in GC-reicher Umgebung (Larsen *et al.* 1995). Sie weist jedoch nur eine geringe Homologie zur Consensussequenz T-A-T-A-A/T-A-A/T (Orphanides *et al.* 1996) auf. Unmittelbar stromaufwärts der TATA-Box findet sich ein „IIB recognition element“ (BRE) mit der Sequenz G-C-A-C-G-G, die eine hohe Homologie zur Consensussequenz G/C-G/C-G/A-C-G-C-C (Lagrange *et al.* 1998) besitzt. Stromabwärts des Inr-Elementes wurde ein CT-Signal (Larsen *et al.* 1995) mit der Sequenz C-G-G-C-G-G bei Posi-

tion 7883-7888 (+10-+15) gefunden sowie ein „downstream promoter element“ (DPE; Burke & Kadonaga 1996) mit der Sequenz A-G-A-G-G-T-T bei Position 7898-7904 (+25-+31) die jeweils hohe Homologie zur entsprechenden Consensussequenz C-T-N-C-N-G bzw. A/G-G-A/T-C-G-T-G aufweisen.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse und des Reporter-gen-Assays sprechen am ehesten dafür, daß der tatsächliche Transkriptionsstartpunkt 14 Nucleotide stromaufwärts des durch Sequenzierung von cDNA-Klonen (Eisel 1997) ermittelten Startpunktes liegt. Ein S1-Nuclease-Assay zur Kartierung des Transkriptionsstarts könnte zur weiteren Klärung der Frage beitragen.

## 5.2 Upstream-Promotor-Elemente des *Fre2*-Promotors

Stromaufwärts des vermuteten Transkriptionsstartpunktes wurde durch Sequenzanalyse eine Reihe von potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen (Upstream-Promotor-Elemente) gefunden. Die entsprechenden Transkriptionsfaktoren werden teils ubiquitär, teils zelltypspezifisch exprimiert, so daß über die Identifizierung tatsächlicher Bindestellen ein indirekter Rückschluß auf das Expressionsmuster des Gens möglich ist.

Die Expression des *Fre2*-Gens ist in hämatopoetischen Zellen (erythroide, lymphatische, myeloide Zelllinien und Hybridomazellen) deutlich höher als in nicht-hämatopoetischen Zellen (Fibroblasten, Hepatozytenzelllinie; Eisel 1997). In diesem Zusammenhang fiel auf, daß eine Reihe potentieller Bindestellen hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren wie Ikaros, MZF, Myb und GATA1 im *Fre2*-Promotor vorliegen.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Transkriptionsfaktoren wurde eine erste Abschätzung ihrer möglichen Funktion und Bedeutung im *Fre2*-Gen-Promotor versucht.

Der Transkriptionsfaktor **Yin Yang 1 (YY1)** ist in der Lage, an ein Initiator-Element zu binden, ähnlich wie TBP nach Bindung an den Core-Promotor Pol II zu rekrutieren und eine akkurate basale Transkription zu ermöglichen (Seto *et al.* 1991; Usheva & Shenk 1994). Eine Aktivator-Funktion des Faktors YY1 in Cooperation mit dem Adenovirus-E1A-Protein, das die Repressorfunktion von YY1 aufhebt, wird ebenfalls für eine Reihe von Genen beobachtet (Shi *et al.* 1991). Eine der beiden Repressor-Domänen von YY1 besitzt Zelltypspezifität. Repression durch YY1 betrifft eine Reihe differenzierungs- und entwicklungsspezifische Gene wie z. B. das  $\epsilon$ -Globin-Gen (Shi *et al.* 1997). Aufgrund der Lokalisation der YY1-Bindestelle

überlappend mit einem Inr-Element im *Fre2*-Gen-Promotor ist am ehesten eine Funktion als Inr-bindender Faktor anzunehmen.

Für den Faktor **NF1/CTF** wird eine Aktivatorfunktion beschrieben. Im *p53*-Promotor binden an das NF1-Bindemotiv sowohl NF1 als auch YY1. Es werden jedoch gewebsspezifische Präferenzen für je einen der Faktoren gefunden, die möglicherweise die gewebsspezifische Expression des *p53*-Gens beeinflussen (Furlong *et al.* 1996). Die Aktivatordomäne des NF1 interagiert direkt mit TBP (Xiao *et al.* 1994). NF1 wird wie auch GATA1 in unreifen erythroiden Zellen höher exprimiert als in differenzierten Erythrozyten und ist wie GATA1 an der erythroid-spezifischen Genregulation beteiligt (Sun *et al.* 1996). Im *Fre2*-Promotor findet sich die potentielle NF1-Bindesequenz auf dem Gegenstrang zur YY1-Bindestelle innerhalb der Core-Promotor-Region. Es ist sowohl eine Kompetition der beiden Faktoren um die Bindestelle mit gewebsspezifischer Regulation der Expression wie im *p53*-Promotor denkbar, als auch eine Präferenz für die Bindung des Faktors YY1 aufgrund seiner Funktion als Inr-bindender Faktor.

Der Faktor **AP4** wirkt als Transaktivator viraler und zellulärer Gene (Hu *et al.* 1990). Im *Fre2*-Gen befindet sich ein AP4-Bindemotiv im untersuchten 92-bp-Abschnitt des Promotors. Vermutlich trägt AP4 zur transkriptionsaktivierenden Wirkung des *Fre2*-Promotors bei.

Der Aktivator **NRF2/GABP** bindet wie auch NFR1 in Promotoren nukleärer Gene, deren Produkten eine Funktion in den Mitochondrien zukommt, wie z. B. in der Atmungskette oder der Hämsynthese (Gugnera *et al.* 1996). NRF2/GABP besitzt eine Ets-DNA-Bindedomäne (LaMarco *et al.* 1991), was erklärt, weshalb weitere Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie (Ets1, Elk1) im *Fre2*-Promotor potentiell im Bereich der NRF2/GABP-Bindesequenz binden können. Welcher dieser um eine Bindesequenz konkurrierenden Faktoren funktionell bedeutsam ist, könnte vom Zelltyp und anderen die differentielle Expression von Transkriptionsfaktoren beeinflussenden Faktoren abhängig sein.

Der Transkriptionsfaktor **Elk1** gehört zur Ets-Familie und wird in Lungengewebe und Testis exprimiert (Rao *et al.* 1989). Elk1 bindet entweder allein oder, wie im *c-fos*-Promotor, zusammen mit SRF als Komplex an DNA. Die Aktivierungsdomäne von Elk1 wird durch Phosphorylierung durch die MAP-Kinase reguliert (Marais *et al.* 1993). Im *Fre2*-Promotor findet sich benachbart zum Elk-Bindemotiv kein SRE (serum response element), so daß eine Bindung mit SRF als Komplex nicht möglich ist. Da das Expressionsmuster von Elk1 nicht mit

dem des *Fre2*-Gens übereinstimmt, spielt Elk1 vermutlich keine Rolle in der Regulation des *Fre2*-Promotors.

**Ets1** gehört ebenfalls zur Ets-Familie von Transkriptionsfaktoren, denen das DNA-bindende Ets-Motiv gemeinsam ist und wirkt als Transkriptionsaktivator. Durch Interaktion mit AP1 wird die aktivierende Wirkung von Ets1 verstärkt (Wasylyk *et al.* 1990). Ets1 wird als spezifischer Effektor des Ras-Signalwegs beschrieben (Yang *et al.* 1996) und wird außerhalb der Embryonalentwicklung vorwiegend im lymphoiden System exprimiert (Kola *et al.* 1993). Die Expression von Ets1 im Stromagewebe von Tumoren korreliert mit der Tumordinvasion (Wernert *et al.* 1994). Im *Fre2*-Promotor könnte Ets1 als ein durch exogene Faktoren über den Ras-Signalweg modulierter Aktivator, vielleicht in Kooperation mit AP1 und AP2, eine Funktion für die *Fre2*-Expression in lymphoiden Zellen haben. Ein Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren (GATA1, Ik2, MZF), deren Expressionsmuster andere hämatopoetische Zelllinien umfaßt, kann zur beobachteten verstärkten Expression von *Fre2* in verschiedenen hämatopoetischen Zellen (Eisel 1997) führen.

Der Transkriptionsaktivator **AP2** wird in Zellen ektodermalen Ursprungs exprimiert und ist durch Retinsäure (RA) induzierbar (Williams & Tjian 1991). Ein funktionelles AP2-Element findet sich u. a. im *p21*-Promotor, wodurch möglicherweise eine Verbindung von dem Differenzierungsassoziierten Faktor AP2 mit Zellzyklus-Regulation und Wachstumskontrolle hergestellt wird (Zeng *et al.* 1997). Die AP2-Aktivität kann cAMP-induziert gesteigert werden (Imagawa *et al.* 1987), was ein Faktor bei der beobachteten Steigerung der *Fre2*-Promotor-Aktivität nach Verwendung neuen Zellkulturmediums sein könnte. Im *Fre2*-Promotor befinden sich zwei AP2-Bindemotive, jedoch entspricht das für AP2 beschriebene Expressionsmuster nicht der Expression von *Fre2*.

Der Faktor **Ik2** wirkt als Transkriptionsaktivator und wird durch das *Ikaros*-Gen codiert. Durch differentielles Spleißen entstehen die mRNAs für Ik1-Ik6 (Molnár & Georgopoulos 1994). Die Expression des *Ikaros*-Gens ist auf das lymphopoetische System und das Corpus striatum beschränkt und spielt eine wesentliche Rolle in der T-Zell-Differenzierung (Georgopoulos *et al.* 1992). Das Expressionsmuster des Faktors Ik2 stimmt nicht mit der für das *Fre2*-Gen beobachteten erhöhten Expression in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien sowie im Milzgewebe der Maus (Eisel 1997) überein. Eine mögliche Erklärung wäre, daß das Ik2-Bindemotiv für die Funktion des *Fre2*-Promotors eine eher untergeordnete Rolle spielt und Faktoren mit einem Expressionsmuster, das mehrere hämatopoetische Zelllinien umfaßt,



die differentielle Expression des *Fre2*-Gens steuern. Eine andere Möglichkeit wäre, daß Ik2 isoliert für die Regulation des *Fre2*-Gens in lymphopoetischen Zellen verantwortlich ist, während die verstärkte Expression in myelopoetischen bzw. erythroiden Zellen von anderen Faktoren wie MZF1 und GATA1 gesteuert wird. Das Expressionsmuster des *Fre2*-Gens würde sich so durch das Zusammenspielen verschiedener hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren erklären.

Für **CDP/Cut** wurde eine Repressorfunktion im *gp91-phox*-Promotor beschrieben (Skalnik *et al.* 1991). CDP/Cut spielt eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung während der Embryogenese (Ludlow *et al.* 1996). Eine Repressorfunktion von CDP/Cut im *Fre2*-Promotor in der Embryogenese wäre denkbar, jedoch wird unter den Bedingungen des Reporter-gen-Assays diese Repressorwirkung nicht beobachtet: die CDP/Cut-Bindesequenz liegt innerhalb des kürzeren, stärker aktivierenden Abschnittes des *Fre2*-Promotors.

**USF/MLTF** aktiviert die Transkription vom Adenovirus major late promoter (MLP) durch Stabilisierung des Initiationskomplexes (Carcamo *et al.* 1989). Außerdem bindet USF/MLTF an das Initiator-Element und interagiert mit TFII-I (Roy *et al.* 1991). Im *Fre2*-Promotor liegt das USF/MLTF-Bindemotiv innerhalb des im Luciferase-Assay stärker aktivierend wirkenden 92-bp-Promotorabschnitts. Möglicherweise trägt der Faktor USF/MLTF zu dieser Aktivierung bei.

Der Faktor **AP1** ist ein Heterodimer bestehend aus den beiden Proteinen Jun und Fos (Curran & Franza 1988). Fos und Jun sind durch Wachstumsfaktoren, Serum oder Phorbol-ester induzierbar, so daß Zielgene wachstumsfaktorabhängig aktiviert werden können (Lamph *et al.* 1988). In erythroiden Zellen ist Epo in der Lage, die AP1-Aktivität über einen Proteinkinase-C-(PKC)-abhängigen Signalweg zu steigern (Patel & Sytkowski 1995). Im untersuchten Abschnitt des *Fre2*-Promotors finden sich vier AP1-Bindemotive, die möglicherweise eine Wachstumsfaktor-induzierte Promotoraktivierung vermitteln. Eine Steigerung der Promotoraktivität, wie sie bis etwa um den Faktor zehn für die *Fre2*-Promotor-Reporter-gen-Konstrukte nach der Verwendung eines neuen Zellkulturmediums beobachtet wurde, könnte so erklärt werden. Der in erythroiden Zellen exprimierte Faktor NF-E2 bindet an eine AP1-ähnliche Sequenz u. a. in der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin-LCR (Andrews *et al.* 1993).

**COUP-TF** („chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor“) wurde zuerst als Aktivator im Promotor des Ovalbumin-Gens beschrieben (Wang *et al.* 1989). Eine wichtige Rolle wird COUP-TF in der Entwicklung und Organogenese zugeschrieben, wo er Repressor-

funktion besitzt (Leng *et al.* 1996). COUP-TF wird im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert sowie einer Reihe anderer Gewebe (Pereira *et al.* 1995). In menschlichen Gehirnzellen wirkt COUP-TF als Transkriptionsaktivator der HIV-1-Genexpression (Sawaya *et al.* 1996). Eine Repressorfunktion für COUP-TF im *Fre2*-Gen-Promotor scheint eher unwahrscheinlich, da das COUP-TF-Bindemotiv innerhalb des im Reportergen-Assay stärker aktivierend wirkenden Promotorabschnittes liegt. Denkbar wäre eine wie für den Promotor des Ovalbumin-Gens berichtete Aktivatorfunktion, jedoch stimmt das für COUP-TF beschriebene Expressionsmuster nicht mit dem des *Fre2*-Gens überein.

Der Östrogen-Rezeptor (**ER**) wird durch Bindung des Hormonliganden aktiviert und transloziert aus dem Cytosol in den Nucleus. Dort kann nach Bindung als Dimer an ein entsprechendes „estrogen responsive element“ (ERE) eine Transkriptionsaktivierung oder auch eine Repression der Expression des nachgeschalteten Gens erfolgen (Beato 1989). Es gibt bisher keine Hinweise darauf, daß das *Fre2*-Gen östrogenabhängig exprimiert wird.

Der Faktor **RORA** (retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha) wird in umschriebenen Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) exprimiert und scheint an der Differenzierung neuraler Zellen beteiligt zu sein (Matsui *et al.* 1995). Das *Fre2*-Gen wird in Nervengewebe vergleichsweise gering exprimiert (Eisel 1997), so daß RORA keine wesentliche Rolle als Transaktivator im *Fre2*-Gen spielen dürfte.

Der Transkriptionsfaktor **MZF1** wird bevorzugt in myeloiden Zellen exprimiert und führt bei Überexpression zur Transformation von 3T3-Zellen (Hromas *et al.* 1996). MZF1-Bindemotive wurden z. B. im Promotorbereich des *CD34*-Gens (He *et al.* 1992) und des Myeloperoxidase-Gens (Morishita *et al.* 1987) entdeckt. In hämatopoetischen Zellen bewirkt MZF1 eine Transkriptionsaktivierung, während in nicht-hämatopoetischen Zellen eine Repressorfunktion beobachtet wird, die jedoch nicht durch ein MZF1-Bindemotiv vermittelt wird, sondern möglicherweise indirekt über Interaktion mit anderen Repressoren zustandekommt (Hromas *et al.* 1996).

Der Faktor **Sp1** bindet an GC-Box-Elemente und wirkt als Transkriptionsaktivator (Briggs *et al.* 1986). Durch Interaktion mit dem Inr-bindenden Faktor YY1 führt die Bindung von Sp1 an ein GC-Box-Element im Promotor zu einer erhöhten Transkriptionsinitiationsrate am Inr-Element (Seto *et al.* 1993). Es wird ein synergistischer Effekt für die erythroiden Faktoren GATA1, EKLF und das ubiquitäre Sp1 (Merika & Orkin 1995) beschrieben, sowie Wechselwirkung mit E2F (Karlseder *et al.* 1996). Interaktionen mit AP1, AP2 und CTF werden ver-

mutet (Briggs *et al.* 1986). Sp1 wird außerdem mit dem Erhalt unmethylierter CpG-Inseln in Verbindung gebracht (Brandeis *et al.* 1994). Im *Fre2*-Gen-Promotor finden sich Bindemotive für einige der Faktoren, mit denen Sp1 interagiert, so daß komplexe Regulationsmöglichkeiten eine Beteiligung des Faktors Sp1 an der Transkriptionsregulation des *Fre2*-Gens wahrscheinlich machen.

**Myb** besitzt neben der DNA-Bindedomäne eine Transaktivierungsdomäne sowie eine negativ-regulatorische Domäne (Sakura *et al.* 1989). Das Onkoprotein Myb spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung, der Hämatopoese sowie der erythroiden Differenzierung. Myb wird häufig als spezifischer Faktor in hämatopoetischen Zellen beschrieben, was jedoch durch den Nachweis der *c-Myb*-Expression in einer Reihe anderer Gewebe in Frage gestellt wird (Ness 1996). Die Mechanismen der Transkriptionsregulation eines Zielgenes durch den Transkriptionsfaktor Myb sind komplex und in einigen Fällen von der Interaktion mit anderen Proteinen abhängig, wie zum Beispiel mit dem Faktor NF-M bei der Aktivierung des *mim-1*-Promotors (Ness *et al.* 1993).

Der Faktor **deltaEF1** ( $\delta$ EF1) wirkt am  $\delta$ -Cristallin-Enhancer-Element als Repressor und wird während der Embryogenese vorwiegend in mesodermalen Zellen exprimiert (Funahashi *et al.* 1993). Die Repressorfunktion des Faktors deltaEF1 kann durch Konkurrenz mit E2-Box-bindenden Aktivatoren (z. B. MyoD) vermittelt werden (Sekido *et al.* 1994). Da im *Fre2*-Promotor benachbart zur deltaEF1-Bindesequenz keine E2-Box gefunden wurde, kommt dem Repressor deltaEF1 in der Kontrolle des *Fre2*-Gens vermutlich keine Bedeutung zu. Denkbar wäre jedoch eine bislang nicht bekannte Konkurrenz mit anderen Aktivatoren wie dem Faktor AP1, der im Gegenstrang zur deltaEF1-Bindesequenz im *Fre2*-Promotor binden kann.

Der Transkriptionsfaktor **GATA1** spielt eine entscheidende Rolle in der Erythropoese, und funktionell bedeutsame GATA-Bindemotive wurden in nahezu allen erythroid-spezifischen Genen gefunden. Darüber hinaus verhindert GATA1 Apoptose in erythroiden Vorläuferzellen (Weiss & Orkin 1995). CBP (CREB-binding protein) ist ein wichtiger Cofaktor für GATA1 und beeinflusst die GATA1-Aktivität durch Acetylierung (Hung *et al.* 1999).

Zusammenfassend kann für folgende Faktoren eine mögliche Bedeutung für die Promotorfunktion im *Fre2*-Gen angenommen werden: YY1 bindet vermutlich als Inr-bindender Faktor in der Core-Promotor-Region. NF1 konkurriert möglicherweise gewebsspezifisch mit YY1 um diese Region. AP1 und Sp1 wirken ubiquitär exprimiert als Aktivatoren. Die Faktoren Ets1, MZF und GATA1 sind möglicherweise synergistisch als Aktivatoren, die in verschie-

dene hämatopoetischen Zelllinien exprimiert werden, für die verstärkte Expression des *Fre2*-Gens in hämatopoetischen Zellen verantwortlich, jedoch konnte dies im Luciferase-Assay nach Transfektion von HCD-57-Zellen nicht bestätigt werden. Dem Faktor Myb kommt möglicherweise Repressorfunktion zu, was die schwächere Promotorfunktion des 234-bp-Promotorabschnittes im Luciferase-Assay erklären könnte.

Welchen dieser potentiellen Bindestellen tatsächlich funktionelle Bedeutung zukommt, läßt sich nur experimentell durch Herstellung von Deletionsmutanten des *Fre2*-Promotors und gezielte Mutagenese einzelner Bindemotive für einen Reporter-gen-Assay sowie durch DNase-I-*in-vitro*-Footprinting (DNA-Schutzexperiment) herausfinden (Neurath *et al.* 1997). Erste Hinweise ergaben sich durch den Vergleich zweier unterschiedlich langer Promotor-Abschnitte im Luciferase-Assay.

Bei der Bewertung der Ergebnisse von Reporter-gen-Assays sollte jedoch berücksichtigt werden, daß es sich bei den transfizierten Reporter-gen-Vektoren um DNA handelt, die nicht in Chromatin organisiert ist. Einflüsse der Chromatinstruktur auf die Transkriptionsaktivität können in diesem System nicht untersucht werden.

### **5.3 Vergleich zweier unterschiedlich langer Abschnitte des *Fre2*-Promotors im Luciferase-Assay**

Mit Hilfe des Luciferase-Reporter-gen-Assays sollte experimentell überprüft werden, ob die stromaufwärts des von D. Eisel (1997) bestimmten Transkriptionsstarts des *Fre2*-Gens gelegene Sequenz Promotorfunktion hat. Um darüber hinaus erste Aussagen über positiv- und negativ-regulatorische Abschnitte innerhalb dieser potentiellen Promotorsequenz machen zu können, wurden zwei unterschiedlich lange Abschnitte in den Reporter-gen-Vektor kloniert, wobei der kürzere Abschnitt in dem längeren enthalten war. Mit Hilfe des Luciferase-Assays ließ sich nachweisen, daß beide Promotorabschnitte eine Expression des Reporter-gens bewirken und damit Promotorfunktion haben. Es zeigte sich, daß die Menge der zur Transfektion eingesetzten DNA von Bedeutung für das Ergebnis des Luciferase-Assays war: Wurden 2 µg Vektor-DNA transfiziert (Versuchsreihe 1), konnte bei einer Luciferase-Aktivität, die im Vergleich mit der Eichkurve etwa 10 µg/l Luciferase entsprach, kein signifikanter Unterschied für die beiden unterschiedlich langen Promotorabschnitte ermittelt werden. Bei Verringerung der transfizierten DNA-Menge auf 1 µg (Versuchsreihe 2) wurde für den Vektor I.2.30 mit dem

92-bp-Promotor-Abschnitt eine deutlich höhere Luciferase-Aktivität bestimmt als für den Vektor I.1.11 mit dem längeren 234-bp-Promotor. Daraus läßt sich folgern, daß nach einer Transfektion von 2 µg Vektor-DNA die gemessene Luciferase-Aktivität bereits am oberen Ende des Bereichs liegt, für den ein linearer Zusammenhang zwischen Luciferase-Konzentration und Lichtemission besteht und entweder technische Parameter im Zusammenhang mit der Messung oder biologische Grenzen der Proteinexpression in den Zellen die potentielle weitere Steigerung der Luciferase-Expression durch den stärkeren Promotor limitieren. Aufgrund dieser Überlegungen muß davon ausgegangen werden, daß das Ergebnis der Transfektion von 1 µg DNA das Aktivierungspotential der beiden Promotorabschnitte korrekt wiedergibt.

#### 5.4 Induktion des *Fre2*-Promotors durch Wachstumsfaktoren?

In Versuchsreihe 2 wurde für den Vektor I.1.11, der den 234-bp-Promotorabschnitt enthält, eine 6,0- bis 8,0-fache Steigerung der Luciferase-Aktivität gegenüber dem Kontrollvektor pluci3 basic (relative Luciferase-Aktivität) gemessen, für den Vektor I.2.30 mit dem 92-bp-Promotorabschnitt eine Steigerung um den Faktor 11,5 bis 13,8. Nach Verwendung eines neuen Ansatzes des Zellkulturmediums wurden nun für den Vektor I.1.11 eine relative Luciferase-Aktivität von 25,7 bis 59,8, für den Vektor I.2.30 von 127,8 bis 255,0 gemessen (Versuchsreihe 4).

Diese Steigerung der Promotoraktivität für beide Promotorabschnitte nach Verwendung eines neuen Ansatzes des Zellkulturmediums gegenüber den vorausgegangenen Messungen könnte durch instabile Bestandteile des Mediums, die das Wachstum der Zellen beeinflussen, bedingt sein. Zu den Transkriptionsfaktoren, die durch Wachstumsfaktoren induziert werden, gehört AP1. Von den vier AP1-Bindesequenzen im *Fre2*-Promotor finden sich zwei im 92-bp-Promotorabschnitt, die anderen beiden im restlichen Teil des 234-bp-Promotors, so daß im Reporter-gen-Assay sowohl Vektor I.1.11 als auch Vektor I.2.30 von einer erhöhten AP1-Expression der Zellen beeinflußt würde. Zusätzlich finden sich zwei AP2-Bindemotive, die den Effekt einer cAMP-induzierten Steigerung der AP2-Aktivität (Imagawa *et al.* 1987) am *Fre2*-Promotor vermitteln könnten. Dieser Hypothese steht die Beobachtung entgegen, daß die Aktivität des Kontrollvektors mit dem frühen SV40-Promotor/Enhancer im Vergleich zu den *Fre2*-Promotor-Vektoren sehr niedrig ist. Obwohl der frühe SV40-Promotor/Enhancer innerhalb der beiden 72-bp-Repeats Bindemotive für AP1 und AP2 besitzt, scheint sich hier der für den *Fre2*-Promotor beobachtete Effekt nicht auszuwirken. Möglicherweise ist der Aktivie-

rungeffekt jedoch von weiteren Faktoren abhängig, die am *Fre2*-Promotor, nicht jedoch am frühen SV40-Promotor/Enhancer wirksam sind. Ein Kandidat könnte der Faktor Ets1 sein, für den synergistische Interaktion mit AP1 (Wasylyk *et al.* 1990) und eine Aktivierung über den Ras-Signalweg (Yang *et al.* 1996) beschrieben wird. Ets1 besitzt im *Fre2*-Promotor drei potentielle Bindemotive, jedoch keine im frühen SV40-Promotor/Enhancer.

Die beobachtete Steigerung der Promotoraktivität durch exogene Faktoren, die möglicherweise das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflussen, widerspricht der Hypothese, es könne sich beim *Fre2*-Gen um ein Haushaltsgen mit einem entsprechend ubiquitären und stabilen Expressionsmuster handeln.

### **5.5 Vergleich der Ergebnisse des Luciferase-Assays in Fibroblasten (Rat-1) und hämatopoetischen Zellen (HCD-57)**

Bindemotive für hämatopoetische Transkriptionsfaktoren befinden sich bis auf eine Bindestelle für Ik2 ausschließlich im 234-bp-Promotorabschnitt. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, daß in hämatopoetischen Zellen (HCD-57) durch den 234-bp-Promotor eine stärkere Aktivierung des Reportergens zu erwarten sei als in den zuvor untersuchten Fibroblasten (Rat-1-Zellen). Wider Erwarten zeichnete sich in hämatopoetischen Zellen ein ähnliches Aktivierungsmuster wie in Fibroblasten mit stärkerer Aktivierung des Reportergens durch den 92-bp-Promotor als durch den 234-bp-Promotor ab, obwohl sehr niedrige Meßwerte aufgrund der geringen Transfektionseffizienz einen Vergleich der Absolutwerte erschwerten. Vermutlich sind für die zelltypspezifische stärkere Expression des *Fre2*-Gens in hämatopoetischen Zelllinien andere Mechanismen verantwortlich, wie z.B. in größerer Entfernung zum Transkriptionsstart gelegene Enhancersequenzen oder unterschiedliche DNA-Methylierung.

### **5.6 Bedeutung von Translokationen im Promotorbereich des *Fre2*-Gens für die Tumorentstehung**

Die in fünf Milztumoren F-MuLV-infizierter, erythroleukämischer Mäuse beobachteten DNA-Rearrangements liegen im Bereich des Transkriptionsstarts und Promotors des *Fre2*-Gens (Friedrich *et al.* 1997). Hierdurch ergeben sich verschiedene denkbare Auswirkungen auf die *Fre2*-Expression. Durch Insertionen innerhalb des Core-Promotorbereichs könnte eine

Transkription völlig verhindert werden. Rearrangements im 92-bp-Promotor-Abschnitt, der eine starke Aktivierung im Reporter-Gen-Assay bewirkte, könnten die *Fre2*-Expression deutlich verringern. Im Gegensatz dazu würde eine Insertion, die zur Inaktivierung des stromaufwärts gelegenen Teils des 234-bp-Promotorabschnittes führt, eine mögliche Repressordomäne ausschalten, so daß die *Fre2*-Expression gesteigert wäre. Eine Steigerung der *Fre2*-Expression wäre für die Tumorgenese von Bedeutung, wenn das *Fre2*-Gen als zelluläres Onkogen (Proto-Onkogen) fungiert. Auch eine Funktion des *Fre2*-Gens als Tumorsuppressorgen ist denkbar, zumal für einen der Milztumore Hinweise auf ein Rearrangement beider *Fre2*-Allele oder Deletion eines Allels gefunden wurden (Friedrich *et al.* 1997). In diesem Fall könnte die Verringerung oder der völlige Ausfall der *Fre2*-Expression zur Tumorentstehung beitragen.

## 5.7 Methodische Überlegungen zur Optimierung des Luciferase-Assays für die Untersuchung des *Fre2*-Promotors

Um mit Hilfe des Luciferase-Assays über den Nachweis einer Promotorfunktion für einen potentiellen Promotorabschnitt hinaus graduelle Unterschiede in der Promotoraktivität verschieden langer Abschnitte eines Promotors durch positiv und negativ regulatorische Bereiche entdecken zu können, sollten bezüglich Sensitivität des Assays und Vergleichbarkeit aufeinanderfolgender Versuche einige Voraussetzungen gegeben sein, die durch Veränderungen der Versuchsbedingungen optimiert wurden.

Die zur Transfektion eingesetzte DNA-Menge war, wie oben bereits diskutiert, von Bedeutung für den Nachweis eines Unterschiedes in der Aktivität der beiden unterschiedlich langen Promotorabschnitte. Deshalb wurde die zur Transfektion eingesetzte DNA-Menge von 2 µg auf 1 µg reduziert.

Eine Normierung der gemessenen Luciferase-Aktivität auf den Proteingehalt der Zellysate führte nicht zur erhofften Verbesserung der Vergleichbarkeit der Luciferase-Aktivität der einzelnen Versuche. Die beobachteten Differenzen sind demnach vermutlich nicht auf Unterschiede in der Zellzahl der für den Luciferase-Assay eingesetzten Zellen zurückzuführen.

Um die Vergleichbarkeit dennoch zu verbessern, wurde eine Cotransfektion (Versuchsreihe 3; Abb. 13) mit dem Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukt und dem  $\beta$ -Galactosidase-Vektor pZeoSVLacZ durchgeführt, der den frühen SV40-Promotor/Enhancer enthält. Nach Normierung der Luciferase-Aktivität auf den entsprechenden  $\beta$ -Galactosidase-Wert zeigte sich eine

deutliche Verringerung der Streuung für Messungen aus verschiedenen Versuchen (Abb. 16). Es fiel jedoch auf, daß die gemessene Luciferase-Aktivität für alle Konstrukte deutlich niedriger war als in den vorausgegangenen Versuchen ohne Cotransfektion des  $\beta$ -Galactosidase-Vektors. Besondere Beachtung sollte jedoch der Beobachtung geschenkt werden, daß für den Vektor I.1.11 sehr niedrige Luciferase-Aktivitäten gemessen wurden, die nur wenig über den Werten für den negativen Kontrollvektor lagen, so daß hier von einer selektiven Beeinflussung dieses Vektors durch die Cotransfektion mit dem  $\beta$ -Galactosidase-Vektor ausgegangen werden muß. Ähnliche Effekte wurden kürzlich von Adam *et al.* (1996) für die Untersuchung des *PDGF-B*-Promotors und Enhancers mittels CAT-Assay und Cotransfektion eines  $\beta$ -Galactosidase-Referenzplasmids unter Kontrolle des frühen SV40-Promotor/Enhancer oder des CMV-Promotor/Enhancer sowie von Bergeron *et al.* (1995) für einen  $\beta$ -Galactosidase-Expressionsvektor unter Kontrolle des frühen SV40-Promotor in Cotransfektionen mit verschiedenen Vektoren beschrieben.

Der Einfluß des Referenzplasmids auf das Reportergenkonstrukt ist konzentrationsabhängig (Adam *et al.* 1996). In dem zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten Reportergen-System zeigte sich, daß die zur Transfektion verwendete DNA-Menge für den Luciferase-Vektor nach oben durch die hohe Sensitivität des Assays begrenzt war, während für den  $\beta$ -Galactosidase-Vektor ein vergleichsweise wenig empfindliches Nachweisverfahren die Menge der transfizierten DNA nach unten limitierte. Eine Verringerung des Verhältnisse des Referenzplasmids zum Luciferase-Reportergen-Plasmid, und damit möglicherweise verbunden eine Verhinderung der Beeinflussung der Reportergen-Expression, ließe sich durch Etablierung eines sensitiveren Nachweisverfahrens für  $\beta$ -Galactosidase z. B. durch ein Chemilumineszenz-Substrat (Jain & Magrath 1991) erzielen. Eine weitere Alternative wäre die Verwendung eines inzwischen kommerziell erhältlichen „Dualen Luciferase-Reporter-Gen-Assay“ (Promega), wo eine Abstimmung der beiden cotransfizierten Vektoren aufeinander zu erwarten ist.

Da weder die Normierung der Luciferase-Aktivität auf die Proteinmenge im Zellysat noch die Cotransfektion mit einem  $\beta$ -Galactosidase-Referenzplasmid eine Verbesserung bezüglich der direkten Vergleichbarkeit von Folgeexperimenten gebracht hat, wurde die relative Luciferase-Aktivität mit bezug auf den negativen Kontrollvektor bestimmt, um Experimente zu vergleichen. Die relative Luciferase-Aktivität ist ein brauchbarer Wert, um Wiederholungsexperimente trotz unbeeinflubarer Schwankungen der absoluten Meßwerte (RLU) vergleichbar zu machen. Abweichungen der Meßwerte für den negativen Kontrollvektor, der als Bezugspunkt



innerhalb eines Versuches dient, können jedoch Fehler verursachen, die diese Vergleichbarkeit beeinträchtigen.

### 5.8 Versuche zur Herstellung einer DNA-Sonde zur Colony-Hybridisierung einer genomischen Cosmid-Bibliothek

Um einen Cosmid-Klon mit der vollständigen Sequenz des Intron 2 zu erhalten, sollte eine Sonde aus der Sequenz des Exon 3 zum Screenen einer Cosmid-Bibliothek hergestellt werden. Es zeigte sich jedoch, daß diese Sequenz als Sonde im Southern-Blot eine sehr hohe unspezifische Bindung an DNA in den Laufspuren aufwies, was vermutlich auf repetitive Sequenzen im Exon 3 zurückzuführen ist. Veränderungen im Hybridisierungsprotokoll, Absättigung des Blots mit sonifizierter Mäuse-DNA und Verkürzung der Sondensequenz auf 293 bp aus dem weniger repetitive Abschnitte enthaltenden 3'-Bereich führten nicht zu ausreichender Steigerung der Spezifität. Da diese Sonde deshalb im Colony-Blot einen hohen Anteil falsch positiver Signale lieferte, erschien sie zum Screenen einer Cosmid-Bibliothek als nicht geeignet.

### 5.9 Ausblick

Zur weiteren Charakterisierung des *Fre2*-Promotors könnten folgende Versuche hilfreich sein:

- Ein S1-Nuklease-Verdau kann zur exakten Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts eingesetzt werden.
- In einem Bandshift-Assay oder einem DNase-I-Footprinting (DNA-Schutzexperiment) können durch den Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen Transkriptionsfaktor-Bindestellen experimentell ermittelt werden.
- Durch gezielte Mutagenese oder Deletion der Bindemotive für Myb und deltaEF2 im 234-bp-Promotorabschnitt könnte im Luciferase-Assay die Hypothese einer möglichen Repressorfunktion dieser Faktoren im *Fre2*-Promotor überprüft werden. Mit Mutationen oder Deletionen von AP1- und Sp1-Bindemotiven könnte die vermutete Aktivatorfunktion dieser Faktoren getestet werden.

- Zur Abklärung des Einflusses exogener Faktoren auf die Aktivität des *Fre2*-Promotors könnten parallel durchgeführte Transfektionen mit unterschiedlichen Bedingungen für die Kultivierung der entsprechenden Zellen dienen (z. B. Minimalmedium vs. Medium mit höherem Serumanteil). Durch einen Vergleich der Ergebnisse des anschließenden Luciferase-Assays könnte die Hypothese der Induzierbarkeit der *Fre2*-Promotoraktivität, vermutlich über die verstärkte Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren, bestätigt oder widerlegt werden.

Um im Colony-Blot einer genomischen Cosmid-Bibliothek einen Klon zu identifizieren, der das Intron 2 enthält, könnte folgende Strategie erfolgversprechend sein:

- Zunächst wird mit einer Sonde aus der Sequenz des Exon 2 oder auch des Intron 1 des *Fre2*-Gens, die zuvor im Southern-Blot eindeutige Banden ergeben hat, die Cosmid-Bibliothek nach positiven Klonen durchsucht. Da die Cosmide Inserts von bis zu 40 kb enthalten, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß Klone, die diese Sondensequenz enthalten, auch Intron 2 enthalten. Mit Sequenzierprimern aus dem Ende der noch bekannten Sequenz kann dann der erste Teil des unbekannten Abschnitt sequenziert werden. Die Synthese von Sequenzierprimern aus jeweils sequenzierten Abschnitten erlaubt schrittweise die Sequenzierung des Intron 2.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der Friend-Virus induzierten Erythroleukämie kommt es zur Integration des F-MuLV im *Fre2*-Locus sowie zum Rearrangement des *Fre2*-Locus auch ohne nachweisbare Provirusintegration. Die Struktur des *Fre2*-Gens ist bis auf die Ermittlung der vollständigen Sequenz des Intron 2 aufgeklärt, die Funktion ist jedoch unbekannt. In hämatopoetischen Zellen ist die Expression des *Fre2*-Gens höher als in nicht-hämatopoetischen Geweben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die vermutete Promotor-Region des *Fre2*-Gens in einem Luciferase-Reportergen-Assay auf ihre Funktion untersucht. Es fand sich eine starke Aktivierung der Expression des Reportergens durch einen Promotorabschnitt, der ein 92-bp-Fragment stromaufwärts des Transkriptionsstarts enthält. Eine geringer ausgeprägte Aktivierung wurde durch ein 234-bp-Fragment vermittelt, das den 92-bp-Promotorabschnitt sowie einen weiter stromaufwärts angrenzenden Bereich enthält, von dem offenbar eine negativ-regulatorische Wirkung ausgeht. Beide Promotorabschnitte des *Fre2*-Gens führten in Fibroblasten zu einer stärkeren Expression des Reportergens als der frühe SV40-Promotor/Enhancer. Es fanden sich Hinweise auf eine Induktion des *Fre2*-Promotors durch Veränderungen der Wachstumsbedingungen der transfizierten Zellen, was über induzierbare Transkriptionsfaktoren wie AP1 vermittelt werden könnte. Ein Vergleich der Ergebnisse des Reportergen-Assays in Fibroblasten und erythroiden Zellen ergab für beide Zelllinien ähnliche Ergebnisse mit jeweils stärkerer Transkriptionsaktivierung durch den 92-bp-Promotorabschnitt. Die gewebsspezifische Expression des *Fre2*-Gens wird vermutlich von anderen regulatorischen Elementen (z. B. Enhancer) außerhalb der hier untersuchten Promotor-Region gesteuert.

In einer Analyse der Promotor-Region auf Transkriptionsfaktor-Bindemotive mit Hilfe einer Transkriptionsfaktor-Datenbank ergaben sich potentielle Bindestellen für ubiquitär exprimierte Faktoren wie Sp1 und AP1, sowie für Faktoren, die vorwiegend in hämatopoetischen Zelllinien exprimiert werden, wie GATA1, Ik2 und MZF1. Eine potentielle Repressorfunktion könnte über Bindemotive für Myb und deltaEF1 im stromaufwärts gelegenen Abschnitt des 234-bp-Promotorabschnittes vermittelt werden.

Hybridisierungsexperimente ergaben, daß eine DNA-Sonde aus der Sequenz des Exon 3 des *Fre2*-Gens aufgrund unspezifischer DNA-Bindung durch repetitive Sequenzanteile nicht zum Screenen einer genomischen Cosmid-Bibliothek auf einen Klon, der das Intron 2 des *Fre2*-Gens enthält, geeignet ist.

## 7 Literatur

- Adams, G. I. R., Miller, S. J., Ulleras, E., and Franklin, G. C. (1996). Cell-type specific modulation of PDGF-B regulatory elements via viral enhancer competition: a caveat for the use of reference plasmids in transient transfection assays. *Gene* 178: 25-29
- Alam, J. and Cook, J. L. (1990). Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* 188: 245-254
- Andrews, N. C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M. B., Tempst, P., and Orkin, S. H. (1993). Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 362: 722-728
- Axelrad, A. A., Croizat, H., and Eskinazi, D. (1981). A washable macromolecule from Fv2rr marrow negatively regulates DNA synthesis in erythropoietic progenitor cells BFU-E. *Cell* 26: 233-44
- Ausubel, R. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. (1989). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. John Wiley & Sons, New York
- Bagchi M. K., Tsai S. Y., Tsai M.-J., and O'Malley B. W. (1987). Purification and characterization of chicken ovalbumin gene upstream promoter transcription factor from homologous oviduct cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 4151-4158
- Ben-David, Y. and Bernstein, A. (1991). Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell* 66: 831-834
- Ben-David, Y., Giddens, E. B., Letwin, K., and Bernstein, A. (1991). Erythroleukemia induced by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev.* 5: 908-918
- Bergeron, D., Barbeau, B., Léger, C., and Rassart, E. (1995). Experimental bias in the evaluation of the cellular transient expression in DNA co-transfection experiments. *Cell. Mol. Biol. Res.* 41: 155-159
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., and Cedar, H. (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371: 435-438
- Brandt, L. (1992). Exposure to organic solvents and risk of haematological malignancies. *Leuk. Res.* 16: 67-70
- Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P., and Tjian, R. (1986). Purification and biochemical characterization of the promotor-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234: 47-52
- Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S. A. B., and Kricka, L. J. (1994). Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal. Biochem.* 219: 169-181
- Buratowski, S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77: 1-3
- Burke, T. W. and Kadonaga, J. T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 10: 711-724
- Burke, T. W. and Kadonaga, J. T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11: 3020-3031
- Burley, S. K. and Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* 65: 769-799
- Carcamo, J., Lobos, S., Merino, A., Buckbinder, L., Weinmann, R., Natarajan, V., and Reinberg, D. (1989). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 264: 7704-7714

- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.-J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., Reinberg, D. (1998).** A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5355-5363
- Choy, B., Roberts, S. G. E., Griffin, L. A., and Green, M. R. (1993).** How eukaryotic transcription activators increase assembly of preinitiation complexes. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 58: 199-202
- Clark, J. M. (1988).** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16: 9677-9686
- Cobaleda, C., Pérez-Losada, J., and Sánchez-García, I. (1998).** Chromosomal abnormalities and tumor development: from genes to therapeutic mechanisms. *BioEssays* 20: 922-930
- Conaway, R. C. and Conaway, J. W. (1993).** General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 161-190
- Corden, J., Cadena, D. L., Ahearn, J. M., and Dahmus, M. E. (1985).** A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7934-7938
- Curran, T. and Franza, B. R., Jr. (1988).** Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55: 395-397
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1979).** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23-28
- Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A., and Parker, M. G. (1992).** Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11: 1025-1033
- Darby, S. C., Doll, R., Gill, S. K., and Smith, P. G. (1987).** Long-term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis. *Br. J. Cancer*: 55: 179-190
- De Wet, J., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramani, S. (1987).** Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737
- Du, H., Roy, A. L., and Roeder, R. G. (1993).** Human transcription factor USF stimulates transcription through the initiator element of the HIV-1 and AdML promoters. *EMBO J.* 12: 501-511
- Eisel, D. (1997).** Strukturanalyse des *Fre2*-Gens, einer Integrationsstelle des Friend-Mäuseleukämievirus. Dissertation am Institut für Medizinische Virologie, Gießen
- Eisel, D., Veit, M., Friedrich, U., Pass, M., Sels, F. T., and Friedrich, R. W. (1997).** Fre-2, a locus closely linked to Fv-2, is rearranged in some erythroleukemias induced by Friend murine leukemia virus. *Leukemia* 11 Suppl. 3: 155-159
- Fawell S. E., Lees J. A., White R., and Parker M. G. (1990).** Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60: 953-962
- Flores, O., Ha, I., and Reinberg, D. (1990).** Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 265: 5629-5634
- Friedrich, R. W., Veit, M., Eisel, D., Friedrich, U., Pass, M., and Kozak, C. A. (1997).** *Fre2*, a proviral integration site of Friend murine leukemia virus that is closely linked to *Fv2*. *Leukemia* 11: 619-623
- Friend, C. (1957).** Cell free transmission in adult swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J. Exp. Med.* 105: 307-318
- Funahashi, J., Sekido, R., Murai, K., Kamachi, Y., and Kondoh, H. (1993).** Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development* 119: 433-446

- Furlong, E. E., Rein, T., and Martin, F. (1996).** YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5933-5945
- Gajewski, F. T. and Thompson, C. B. (1996).** Apoptosis meets signal transduction: Elimination of a BAD influence. *Cell* 87: 589-592
- Georgopoulos, K., Moore, D. D., and Derfler, B. (1992).** Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 258: 808-812
- Giguere V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. M., and Otulakowski, G. (1994).** Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of RORalpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* 8: 538-553
- Goff, S. P. (1996).** Operating under a Gag order: a block against incoming virus by the *Fv1* gene. *Cell* 86: 691-693
- Gross, R. und Heimpel, H. (1994).** Erkrankungen der weißen Blutzellen und der blutbildenden Organe. In: Gross, R., Schölmerich, P. und Gerok, W. (eds.). *Die Innere Medizin.* 8. Aufl. SchattauerVerlag Stuttgart
- Grunstein, M. (1997).** Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389: 349-352
- Gugneja, S., Virbasius, C-M. A., and Scarpulla, R. C. (1996).** Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5708-5716
- Harrison, B. and Zimmermann, S. B. (1986).** Stabilization of T4 polynucleotide kinase by macromolecular crowding. *Nucleic Acids Res.* 25: 1863-1870
- Hayashi, K., Nakazawa, M., Ishizaki, Y., and Obayashi, A. (1985).** Influence of monovalent cations on the activity of T4 DNA ligase in the presence of polyethylene glycol. *Nucleic Acids Res.* 13: 3261-3271
- He, X. Y., Antao, V. P., Basila, D., Marx, J. C., and Davis, B. R. (1992).** Isolation and characterization of the human CD34 gene. *Blood* 79: 2296-2302
- Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F., and Wingender, E. (1999).** Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 27: 318-322
- Herbomel P., Bourachot , B., and Yaniv, M. (1984).** Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell* 39: 653-662
- Hromas, R., Davis, B., Rauscher, F. J. 3<sup>rd</sup>, Klemsz, M., Tenen, D., Hoffman, S., Xu, D., and Morris, J. F. (1996).** Hematopoietic transcriptional regulation by the myeloid zinc finger gene, MZF-1. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211: 159-164
- Hromas, R., Collins, S. J., Hickstein, D., Raskind, W., Deaven, L. L., O'Hara, P., Hagen, F. S., and Kaushansky, K. (1991).** A retinoic acid-responsive human zinc finger gene, MZF-1, preferentially expressed in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 266: 14183-14187
- Hu, Y. F., Luescher, B., Admon, A., Mermod, N., and Tjian, R. (1990).** Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev.* 4: 1741-1752
- Hung, H-L., Lau, J., Kim, A. Y., Weiss, M. J., and Blobel, G. A. (1999).** CREB-binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3496-3505
- Hunter, E. and Swanstrom, R. (1990).** Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 157: 187-253

- Hunter, T. (1997).** Oncoprotein networks. *Cell* 88: 333-346
- Ikeda, H., Laigret, F., Martin, M. A., and Repaske, R. (1985).** Charakterisation of a molecularly cloned retroviral sequence associated with *Fv-4* resistance. *J. Virol.* 55: 768-777
- Ikeda, H. and Sugimura, H. (1989).** *Fv-4* resistance gene: a truncated endogenous murine leukemia virus with ecotropic interference properties. *J. Virol.* 63: 5405-5412
- Imagawa, M., Chiu, R., and Karin, M. (1987).** Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51: 251-260
- Imbalzano, A. N., Zaret, K. S., and Kingston R. E. (1994).** Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J. Biol. Chem.* 11: 8280-8286
- Jacobs-Helber, S. M., Wickrema, A., Birrer, M. J., and Sawyer, S. T. (1998).** AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3699-3707
- Jain, V. and Magrath, I. (1991).** A chemiluminescent assay for quantification of  $\beta$ -galactosidase in the femtogram range: Application to quantification of  $\beta$ -galactosidase in lacZ-transfected cells. *Anal. Biochem.* 199: 119-124
- Johnson, A. D. (1995).** The price of repression. *Cell* 81: 655-658
- Johnson, P. H. and Grossman, L. I. (1977).** Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* 16: 4217-4225
- Jonkers, J. and Berns, A. (1996).** Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1287: 29-57
- Kabat, D. (1989).** Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 148: 1-42
- Kadonaga, J. T. (1998).** Eukaryotic transcription: An interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92: 307-313
- Kalyanaraman, V. S., Sarngadharan, M. G., Robert-Guroff, M., Blayney, D., Golde, D., and Gallo, R. C. (1982).** A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 215: 571-573
- Karseder, J., Rotheneder, H., and Wintersberger, E. (1996).** Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1659-1667
- Kim, Y.-J., Björklund, S., Yang, L., Sayre, M. H., and Kornberg, R. D. (1994).** A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77: 599-608
- Knippers, R. (1997).** Molekulare Genetik. 7. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S., and Seth, A. (1993).** The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenic processes such as organ formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7588-7592
- Koleske, A. J. and Young, R. A. (1994).** An RNA polymerase holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368: 466-469
- Kung, H.-J., Boerkoel, C., and Carter, T. H. (1991).** Retroviral mutagenesis of cellular oncogenes: A review with insight into the mechanisms of insertional activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 171: 1-25
- Kuo, M.-H. and Allis, C. D. (1998).** Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 20: 615-626

- Lacombe, C., Chrétien, S., Lemachandel, V., Mayeux, P., Roméo, P.-H., Gisselbrecht, S., and Cartron, J.P. (1991). Spleen focus-forming virus long terminal repeat insertional activation of the murine erythropoietin receptor gene in T3C1-2 Friend leukemia cell line. *J. Biol. Chem.* 266: 6952-6956
- Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebright, R. H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 12: 34-44
- LaMarco, K., Thompson, C. C., Byers, B. P., Walton, E. M., and McKnight, S. L. (1991). Identification of Ets- and Notch-related subunits in GA binding protein. *Science* 253: 789-792
- Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P., and Verma, I. M. (1988). Induction of proto-oncogene *JUN/AP-1* by serum and TPA. *Nature* 334: 629-631
- Larsen, N. I., Engelbrecht, J., and Brunak, S. (1995). Analysis of eukaryotic promoter sequences reveals a systematically occurring CT-signal. *Nucleic Acids Res.* 23: 1223-1230
- Latchman, D. S. (1995a). Eukaryotic transcription factors. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London
- Latchman, D. S. (1995b). Gene regulation: A eukaryotic perspective. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London
- Leng, X., Cooney, A. J., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1996). Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2332-2340
- Ludlow, C., Choy, R., and Blochlinger, K. (1996). Functional analysis of Drosophila and mammalian cut proteins in flies. *Dev. Biol.* 178: 149-159
- Li, J. P., D'Andrea, A. D., Lodish, H. F., and Baltimore, D. (1990). Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature* 343: 762-764
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 851-891
- Lu, S. J., Rowan, S., Bani, M. R., and Ben-David, Y. (1994). Retroviral integration within the Fli-2 locus results in inactivation of the erythroid transcription factor NF-E2 in Friend erythroleukemias: Evidence that NF-E2 is essential for globin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8398-8402
- Ludlow, C., Choy, R., and Blochlinger, K. (1996). Functional analysis of Drosophila and mammalian cut proteins in flies. *Dev. Biol.* 178: 149-159
- Maily, F., Berube, G., Harada, R., Mao, P. L., Phillips, S., and Nepveu, A. (1996). The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5346-5357
- Maldonado, E., Shiekhatar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C. W., Linn, S., and Reinberg, D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* 381: 86-89
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Library, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Manoni, M., Pergolizzi, R., Luzzana, M., and Bellis, G. D. (1992). Dideoxy linear PCR on a commercial fluorescent automated DNA sequencer. *Biotechniques* 12: 48-50, 52-53
- Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73:381-393



- McDonald, J., Beru, N., and Goldwasser, E. (1987).** Rearrangement and expression of erythropoietin genes in transformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 365-370
- McKnight, S. L. (1996).** Transcription revisited: A commentary on the 1995 Cold Spring Harbor Laboratory meeting, "Mechanisms of eukaryotic transcription". *Genes Dev.* 10: 367-381
- Mellon, I. and Hanawalt, P. C. (1989).** Induction of the *E. coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* 342: 95-98
- Merika, M. and Orkin, S. H. (1995).** Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2437-2447
- Modrow, S. und Falke, D. (1997).** Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Molnár, A. and Georgopoulos, K. (1994).** The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 14: 8292-8303
- Molnár, A., Wu, P., Largespada, D. A., Vortkamp, A., Scherer, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Bruns, G., and Georgopoulos, K. (1996).** The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J. Immunol.* 156: 585-592
- Morishita, K., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., and Nagata, S. (1987).** Chromosomal gene structure of human myeloperoxidase and regulation of its expression by granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 262: 15208-15213
- Mostoslavsky, R. and Bergman, Y. (1997).** DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system. *Biochim. Biophys. Acta* 1333: F29-F50
- Moureaux-Gachelin, F., Tavittian, A., and Tambourin, P. (1988).** Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 331: 277-280
- Mullis, K. and Faloona, F. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 55: 335-350
- Muszynski, K. W., Ohashi, T., Hanson, C., and Ruscetti, S. K. (1998).** Both the polycythemia- and the anemia-inducing strains of friend spleen focus-forming virus induce constitutive activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Virol.* 72: 919-925
- Ness, S. A. (1996).** The Myb oncoprotein: regulating a regulator. *Biochim. Biophys. Acta* 1288: F123-F139
- Ness, S. A., Kowenz-Leutz, E., Casini, T., Graf, T., and Leutz, A. (1993).** Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev.* 7: 749-759
- Neurath, M. Ma, X. und Pettersson, S. (1997).** DNA/Protein-Interaktionen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996).** The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10: 2657-2683
- Ossipow, V., Tassan, J.-P., Nigg, E. A., and Schibler, U. (1995).** A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promotor-specific transcription initiation. *Cell* 83: 137-146
- Packham, G. and Cleveland, J. L. (1995).** c-Myc and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1242: 11-28
- Pass, M. (1995).** *Fre2* - ein Gen nahe einer Integrationsstelle des Friend-Mäuseleukämievirus. Dissertation am Institut für Medizinische Virologie, Gießen
- Patel, H. R. and Sytkowski, A. J. (1995).** Erythropoietin activation of AP1 (Fos/Jun). *Exp. Hematol.* 23: 619-625

- Pereira, F. A., Qiu, Y., Tsai, M. J., Tsai, S. Y. (1995).** Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 53: 503-508
- Quandt, K., Frech, K., Wingender, E., and Werner, T. (1995).** MatInd and MatInspector- New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23: 4878-4884
- Rabbitts, T. H. (1994).** Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372: 143-149
- Rao, V. N. and Reddy, E. Sh. P. (1992).** A divergent ets-related protein, Elk-1, recognizes similar c-ets-1 proto-oncogene target sequences and acts as a transcriptional activator. *Oncogene* 7:65-70
- Rao, V. N., Huebner, K., Isobe, M., Ar-Rushdi, A., Croce, C. M., and Reddy, E. S. P. (1989).** *elk*, tissue-specific *ets*-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints. *Science* 244: 66-70
- Risser, R., Horowitz, J. M., and McCubrey, J. (1983).** Endogenous mouse leukemia viruses. *Ann. Rev. Genet.* 17: 85-121
- Robinson, L. L. (1992).** Down syndrome and leukemia. *Leukemia* 6 [Suppl. 1]: 5-7
- Rossignol, M., Kolb-Cheynel, I., and Egly, J.-M. (1997).** Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIF. *EMBO J.* 16: 1628-1637
- Roy, A. L., Meisterernst, M., Pognonec, P., and Roeder, R. G. (1991).** Cooperative interaction of an initiator-binding factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 354: 245-248
- Ruddon, R. W. (1995).** *Cancer Biology*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press
- Ruscetti, S., Davis, L., Feild, J., and Oliff, A. (1981).** Friend murine leukemia virus -induced leukemia is associated with the formation of mink cell focus-inducing viruses and is blocked in mice expressing endogenous mink cell focus-inducing xenotropic viral envelope genes. *J. Exp. Med.* 154: 907-920
- Ruscetti, S. and Wolff, L. (1984).** Spleen focus-Forming Virus: Relationship of an altered envelope gene to the development of a rapid erythroleukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 112: 21-44
- Rusche, J. and Howard-Flanders, P. (1985).** Hexamine cobalt chloride promotes intermolecular ligation of blunt end DNA fragments by T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res.* 13: 1997-2008
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T. J., and Ishii, S. (1989).** Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myc protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5758-5762
- Sanger, F., Nickler, S., and Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Sawadogo, M. (1988).** Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF. *J. Biol. Chem.* 263: 11994-12001
- Sawaya, B. E., Rohr, O., Aunis, D., and Schaeffer, E. (1996).** Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, a transcriptional activator of HIV-1 gene expression in human brain cells. *J. Biol. Chem.* 271: 23572-23576
- Sawyers, C. L., Denny, C. T., and Witte, O. N. (1991).** Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* 64: 337-350
- Schiffer, C. A. and Schimpff, S. C. (1991).** Acute Leukemia. In: Mossa, A. R., Schimpff, S. C., Robson, M. C, (eds.). *Comprehensive Textbook of Oncology*. 2<sup>nd</sup> ed. Williams & Wilkins Baltimore
- Schulz, A. S., Hess, N., and Friedrich, R. W. (1988).** Integration into the cellular genome of a Friend murine leukaemia virus containing a selectable marker reveals a clonal origin of erythroleukaemia. *J. Gen. Virol.* 69: 2663-2669

- Sekido, R., Murai, K., Funahashi, J.-I., Kamachi, Y., Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y.-I., and Kondoh, H. (1994).** The delta-crystallin enhancer-binding protein deltaEF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5692-5700
- Sels, F. T., Langer, S., Schulz, A. S., Silver, J., Sitbon, M., and Friedrich, R. W. (1992).** Friend murine leukaemia virus is integrated at a common site in most primary spleen tumours of erythroleukaemic animals. *Oncogene* 7: 643-652
- Seto, E., Lewis, B., and Shenk, T. (1993).** Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature* 365: 462-464
- Seto, E., Shi, Y., and Shenk, T. (1991).** YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature* 354: 241-245
- Shi, Y., Lee, J.-S., and Galvin, K. M. (1997).** Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1332: F49-F66
- Shi, Y., Seto, E., Chang, L.-S., and Shenk, T. (1991).** Transcription repression by YY1, a human GL1-Krueppel-related RT-protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67: 377-388
- Shpilberg, O., Dorman, J. S., Sharar, A., and Kuller, L. H. (1997).** Molecular epidemiology of hematological neoplasms-Present status and future directions. *Leukemia Research* 21: 265-284
- Silver, J. and Kozak, C. (1986).** Common proviral integration region on mouse chromosome 7 in lymphomas and myelogenous leukemias induced by Friend murine leukemia virus. *J. Virol.* 57: 526-533
- Sitbon, M., Sola, B., Evans, L., Nishio, J., Hayes, S. F., Nathanson, K., Garon, C. F., and Cheseboro, B. (1986).** Hemolytic anemia and erythroleukemia, two distinct pathogenic effects of Friend MuLV: Mapping of the effects to different regions of the viral genome. *Cell* 47: 851-859
- Skalnik, D. G., Strauss, E. C., and Orkin, S. H. (1991).** CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J. Biol. Chem.* 266: 16736-16744
- Smale, S. T. and Baltimore, D. (1989).** The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57: 103-113
- Solomon, E., Borrow, J., and Goddard, A. D. (1991).** Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254: 1153-1160
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- Stayner, L., Steenland, K., Greife, A., Hornung, R., Hayes, R. B., Nowlin, S., Morawetz, J., Ringenburt, V., Elliot, L., and Halperin, W. (1993).** Exposure-response analysis of cancer mortality in a cohort of workers exposed to ethylene oxide. *Am. J. Epidemiol.* 138: 787-798
- Struhl, K. (1996).** Chromatin structure and RNA Polymerase II connection: implications for transcription. *Cell* 84: 179-182
- Sun, J. M., Chen, H. Y., Litchfield, D. W., and Davie, J. R. (1996).** Developmental changes in transcription factors associated with the nuclear matrix of chicken erythrocytes. *J. Cell. Biochem.* 62: 454-466
- Tanese, N. and Tjian, R. (1993).** Coactivators and TAFs: A new class of eukaryotic transcription factors that connect activators to the basal machinery. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 58: 179-184
- Thomas, T. S., Tymms, M. J., McKinlay, L. H., Shannon, M. F., Seth, A., and Kola, I. (1997).** ETS1, NFkappaB and AP1 synergistically transactivate the human GM-CSF promoter. *Oncogene* 14: 2845-2855
- Thompson, J. F., Hayes, L. S., and Lloyd, D. B. (1991).** Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene* 103: 171-177

- Tjian, R. and Maniatis, T. (1994).** Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 5-8
- Tsichlis, P. N. and Lazo, P. A. (1991).** Virus-host interactions and the pathogenesis of murine and human oncogenic retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 171: 95-171
- Usheva, A. and Shenk, T. (1994).** TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* 76: 1115-1121
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 615-619
- Wagener, C. (1996).** Einführung in die molekulare Onkologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1989).** COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature* 340: 163-166
- Watt, F., and Molloy, P. L. (1988).** Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 2: 1136-1143
- Weiss, M., J. and Orkin, S. H. (1995).** Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9623-9627
- Williams, T. and Tjian, R. (1991).** Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 5: 670-682
- Wolff, L., Kaminchik J., Hankins, W. D., and Ruscetti, S. K. (1985).** Sequence comparisons of the anemia- and polycythemia-inducing strains of Friend spleen focus-forming virus. *J. Virol.* 53: 570-578
- Xiao, H., Lis, J. T., Xiao, H., Greenblatt, J., and Friesen, J. D. (1994).** The upstream activator CTF/NF2 and RNA polymerase II share a common element involved in transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* 22: 1966-1973
- Yamamura, Y., Senda, H., Kageyama, Y., Matsuzaki, T., Noda, M., and Ikawa, Y. (1998).** Erythropoietin and friend virus gp55 activate different JAK/STAT pathways through the erythropoietin receptor in erythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1172-1180
- Yang, B. S., Hauser, C. A., Henkel, G., Colman, M. S., Van Beveren, C., Stacey, K. J., Hume, D. A., Maki, R. A., Ostrowski, M. C. (1996).** Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol. Cell. Biol.* 16: 538-547
- Yankulov K. Y., and Bentley, D. L. (1997).** Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIF. *EMBO J.* 16: 1638-1646
- Yokomori, K., Verrijzer, C. P., and Tjian, R. (1998).** An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA binding and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6722-6727
- Yunis, J. J. (1983).** The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221: 227-236
- Zeeb, H. and Blettner, M. (1998).** Adult leukaemia: what is the role of currently known risk factors? *Radiat. Environ. Biophys.* 36: 217-228
- Zeng, Y. X., Somasundaram, K., el-Deiry, W. S. (1997).** AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF/CIP1 expression. *Nat. Genet.* 15: 78-82

## 8 Abkürzungen

(Selten verwendete Abkürzungen für Transkriptionsfaktoren, Promotorelemente, Integrationsstellen und Chemikalien werden im Text erklärt.)

ALL: Akute lymphatische Leukämie

AML: akute myeloische Leukämie

BFU-E: burst-forming unit-erythroid

CFU-E: colony-forming unit-erythroid

CLL: Chronisch-lymphatische Leukämie

CML: Chronisch-myeloische Leukämie

EBV: Epstein-Barr-Virus

Epo: Erythropoetin

EpoR: Erythropoetin-Rezeptor

F-MuLV: Friend murine leukemia virus / Friend-Mäuseleukämievirus

FV-Komplex: Friend-Virus-Komplex

GTF: General transcription factor / allgemeine Transkriptionsfaktoren

HLLV-1: Humanes T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1

HLLV-2: Humanes T-Zell-Leukämie-Virus Typ 2

IG: Immunglobulin

LTR: long terminal repeat

MCFV: mink cell focus inducing virus

MDS: Myelodysplastisches Syndrom

ORF: open reading frame

PCR: Polymerase-Kettenreaktion

SFFV: Spleen focus-forming virus

TCR: T-Zell-Rezeptor

## Poster und Abstracts

- R. W. Friedrich, D. Eisel, S. Burdak, M. Veit, A. Wagner, K. Steffen and U. Friedrich: An atypical mouse mRNA polyadenylation sequence that resembles yeast signal elements is presumably activated by RNA editing. Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik. Gießen 1997
- S. Burdak, D. Eisel, M. Veit, K. Steffen, U. Friedrich, and R. W. Friedrich: Unconventional sequence elements in the mRNAs of the *Fre2* gene. Ninth Workshop on Pathogenesis by Animal Retroviruses. Warrenton, VA, USA 1997
- R. W. Friedrich, U. Friedrich, S. Burdak, D. Eisel, M. Veit and K. Steffen: Structural analysis of *Fre2*, a gene rearranged in some F-MuLV-induced erythroid leukemias. International Workshop on Retroviral Pathogenesis. Newport Beach, California, USA 1998

# **Lebenslauf**

---

## **Persönliche Angaben**

- Name: Susanne Christine Burdak
- Geburtsdatum: 19.12.69
- Geburtsort: Frankfurt/Main
- Staatsangehörigkeit: deutsch

## **Schulische Ausbildung**

- 1976-1980 Grundschule Birstein
- 1980-1984 Gesamtschule Wächtersbach
- 1985-1989 Wolfgang-Ernst-Gymnasium Büdingen
- 1989 Abitur

## **Praktika**

- 1989 dreimonatiges Praktikum in Heil- und Sonderpädagogik
- 1989/90 dreimonatiges Pflegepraktikum

## **Berufsausbildung**

- 1990-1993 Ausbildung zur Beschäftigungs- und Arbeitstherapeutin am Rehazentrum Lippoldsberg

## **Studium**

- 1993 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 1995 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
- 1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1996 und 1997 Auslandsfamulaturen in Irland und Griechenland
- 1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Praktisches Jahr am Lehrkrankenhaus Wetzlar der Justus-Liebig-Universität Gießen (Chirurgie und Innere Medizin) und an der Universitätskinderklinik Gießen (Wahlfach Pädiatrie)
- 05. Mai 1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## **Berufliche Tätigkeit**

- seit 01. Juni 1999 Ärztin im Praktikum an der Klinik für Innere Medizin II der Universität des Saarlandes

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

- Prof. Dr. Roland Friedrich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Betreuung der Arbeit.
- Dr. Ursula Friedrich, Dr. Dirk Eisel, Dr. Kai Steffen, Dr. Markus Veit und Andreas Wagner für die kollegiale Zusammenarbeit und zahlreiche Diskussionen.
- Karin Schultheiss und Irmi Faber-Franek für ihre Unterstützung bei technischen Fragen.
- meinen Eltern für ihre finanzielle und moralische Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.